

Aus der Universitätsfrauenklinik der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

Die kumulative Wirkung von
Leinwurzelextrakt der Pflanze *Linum
usitatissimum* und Tamoxifen auf
östrogenpositive Mammakarzinomzellen

Inauguraldissertation zur Erlangung des
akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin
Rostock
2012

vorgelegt am 25. April 2012

von: Anne Dünnow
geboren am 21. Juli 1983,
in Schwerin

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

Betreuer: Prof. Dr. med. V. Briese, Universitätsfrauenklinik, Klinikum Südstadt Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Briese, Universitätsfrauenklinik, Klinikum Südstadt Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. J. G. Barbara Nebe, Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Medizinische Forschung, Arbeitsbereich Zellbiologie, Schillingallee 69, 18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Jeschke, Klinikum der Universität München, Campus Innenstadt, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Maistraße 11, 80337 München

Datum der Einreichung: 25.04.2012

Datum der Verteidigung: 12.02.2013

gefördert durch die

Dr.-Mildred-Scheel-Stiftung für
Krebsforschung

Nr. 107820

Linum usitatissimum



Abbildung 1: Leinpflanze (I. Brands, 2012)

Heilpflanze des Jahres 2005

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 9 |
| 1.1 Krebserkrankungen | 10 |
| 1.1.1 Demographie und Epidemiologie von bösartigen Krebserkrankungen . | 10 |
| 1.1.2 Definition | 11 |
| 1.2 Das Mammakarzinom | 11 |
| 1.2.1 Epidemiologie | 11 |
| 1.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren | 12 |
| 1.2.3 Medikamentöse Therapie des Mammakarzinoms | 12 |
| 1.2.4 Endokrine Therapie des Mammakarzinoms | 13 |
| 1.2.5 Tamoxifen | 13 |
| 1.3 Hormonrezeptor | 15 |
| 1.4 Steroidhormone | 16 |
| 1.5 Östrogene | 17 |
| 1.5.1 Wirkung der Östrogene | 18 |
| 1.5.2 Bedeutung der Östrogene | 19 |
| 1.6 Phytoöstrogene | 20 |
| 1.6.1 Stoffwechsel der Phytoöstrogene | 22 |
| 1.6.2 Bedeutung der Phytoöstrogene | 23 |
| 1.7 Der Lein- <i>Linum usitatissimum</i> | 26 |
| 1.8 Zielstellung der Arbeit | 28 |
| 2 Material und Methoden | 30 |
| 2.1 Materialien und Chemikalien | 30 |
| 2.1.1 Lignanextraktion nach Luyengi et al. (1996) | 30 |
| 2.1.2 Testverfahren | 30 |
| 2.1.3 Zellkultur | 31 |
| 2.1.4 Immunhistochemie | 32 |
| 2.1.5 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie | 32 |
| 2.2 Methoden | 32 |
| 2.2.1 Pflanzenmaterial | 32 |
| 2.2.2 Extraktion nach Luyengi et al., 1996 | 33 |
| 2.2.3 Extrakte und Kontrollen | 33 |
| 2.2.4 Zellkulturlinien | 35 |
| 2.2.5 Zellkulturmedien | 36 |
| 2.2.6 Zellkultivierung | 36 |
| 2.2.7 Ermittlung der Lebendzellzahl | 37 |

| | |
|---|------------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 3 |
| 2.2.8 Immunhistochemische Untersuchungen | 38 |
| 2.2.9 Testvorbereitung und Testbedingungen | 38 |
| 2.2.10 Versuche zur Zytotoxizität und Zellproliferation | 38 |
| 2.2.11 LDH- Zytotoxizitätstest | 39 |
| 2.2.12 MTT-Zellproliferationstest | 40 |
| 2.2.13 BrdU-Zellproliferationstest | 41 |
| 2.2.14 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie | 43 |
| 2.2.15 Auswertung | 43 |
| 3 Ergebnisse | 45 |
| 3.1 Ergebnisse der Tests | 45 |
| 3.2 LDH-Test | 45 |
| 3.3 MTT-Test | 58 |
| 3.4 BrdU-Test | 64 |
| 3.5 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie | 71 |
| 3.6 Immunhistochemie | 73 |
| 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse | 73 |
| 4 Diskussion | 77 |
| 4.1 LDH-Test | 77 |
| 4.2 MTT-Test | 79 |
| 4.3 BrdU-Test | 80 |
| 4.4 Wirkungen des Östradiols und des Tamoxifens auf die Zelllinien | 82 |
| 4.4.1 Östradiol | 82 |
| 4.4.2 Tamoxifen | 82 |
| 4.5 Interaktionen von Tamoxifen | 85 |
| 4.6 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie | 86 |
| 4.7 Weitere Einflüsse | 87 |
| 4.8 Ernährungsempfehlungen für den klinischen Alltag | 88 |
| 4.8.1 Empfehlungen zur gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen | 89 |
| 5 Zusammenfassung | 90 |
| 6 Ausblick | 92 |
| 7 Thesen | 100 |
| 8 Anhang | 102 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1 | Leinpflanze (I. Brands, 2012) | 1 |
| 1.1 | Leinfeld zur Blütezeit in Belgien [16] | 9 |
| 1.2 | prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006 [82]. | 11 |
| 1.3 | Metabolisierung von Tamoxifen [7]. | 14 |
| 1.4 | Aufbau des Östrogenrezeptors α [64]. | 16 |
| 1.5 | Übersicht der letzten Stufen der Steroidsynthese [56]. | 17 |
| 1.6 | Strukturformel des 17β -Östrogens [60]. | 18 |
| 1.7 | Karzinogenese des Mammakarzinoms [57]. | 19 |
| 1.8 | Strukturformeln der wichtigsten Lignane [60]. | 22 |
| 1.9 | Produktion von Enterodiol und Enterolacton aus Secoisolariciresinol (SECO) und Matairesinol (MATA) [84] | 23 |
| 1.10 | Strukturformeln der wichtigsten Isoflavone [60]. | 24 |
| 1.11 | Strukturelle Ähnlichkeit von Östrogenen und Phytoöstrogenen (hier: das Isoflavon Equol) [82]. | 25 |
| 1.12 | Strukturformeln der wichtigsten Coumestane [60]. | 26 |
| 1.13 | Blüte der Leinpflanze [82]. | 27 |
| 2.1 | Rotationsverdampfer [1]. | 33 |
| 2.2 | Die MCF-7-Zellen unter dem Lichtmikroskop. | 36 |
| 2.3 | Ausschnitt des Zählnetzes unter dem Mikroskop einer Bürker-Zählkammer [3]. | 37 |
| 2.4 | Prinzip des LDH-Tests [82]. | 39 |
| 2.5 | Prinzip des MTT-Tests [82]. | 41 |
| 2.6 | Prinzip des BrdU-Tests [82]. | 42 |
| 2.7 | Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [74]. | 44 |
| 3.1 | Erster LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 46 |
| 3.2 | Erster LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 47 |
| 3.3 | Erster LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 48 |
| 3.4 | Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 49 |
| 3.5 | Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 50 |
| 3.6 | Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 51 |
| 3.7 | Dritter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 52 |
| 3.8 | Dritter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 53 |
| 3.9 | Dritter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 54 |
| 3.10 | Vierter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 55 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

5

| | |
|---|-----|
| 3.11 Vierter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 56 |
| 3.12 Vierter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 57 |
| 3.13 Erster MTT-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 59 |
| 3.14 Erster MTT-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 60 |
| 3.15 Erster MTT-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 61 |
| 3.16 Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 62 |
| 3.17 Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 63 |
| 3.18 Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 63 |
| 3.19 Erster BrdU-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 65 |
| 3.20 Erster BrdU-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 66 |
| 3.21 Erster BrdU-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 67 |
| 3.22 Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). | 68 |
| 3.23 Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. | 69 |
| 3.24 Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle. | 70 |
| 3.25 Graphische Darstellung der Anteile der Substanzklassen der Leinwurzelextrakte (Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie). | 71 |
| 3.26 Graphische Darstellung der Anteile der Substanzklassen der Leinwurzel (Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie). | 72 |
| 3.27 ER α , MCF-7-Zellen. | 75 |
| 3.28 ER β , MCF-7-Zellen. | 75 |
| 3.29 Progesteronrezeptor, MCF-7-Zellen. | 76 |
| 3.30 Negativkontrolle ohne Antikörperzugabe, MCF-7-Zellen. | 76 |
| 4.1 Tamoxifenvergleich im LDH-Test | 83 |
| 4.2 Tamoxifenvergleich im MTT-Test | 84 |
| 4.3 Tamoxifenvergleich im BrdU-Test | 84 |
| 8.1 Darstellung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie in Massensignalen m/z (Leinwurzel). | 102 |
| 8.2 Darstellung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie in Massensignalen m/z (Leinwurzelextrakt). | 103 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Gehalt an Secoisolariciresinol und Matairesinol als wichtige Vertreter der Lignane in ausgewählten Lebensmitteln ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ Trockengewicht)[60]. | 21 |
| 1.2 | Gehalt an verschiedenen Vertretern der Isoflavone in ausgewählten Lebensmitteln ($\text{mg}/100\text{ g}$ Frischgewicht)[60]. | 21 |
| 3.1 | Tabellarische Auflistung der Anteile der Substanzklassen an der Totalintensität und Abkürzungsverzeichnis | 73 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| ABC | Avidin-Biotin-Komplex |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CYP2D6 | Cytochrom-2D6 |
| CYP450 | Cytochrom P450-Aromatase-Komplex |
| dest. | destilliert |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| EDTA | Ethyldiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ER | Östrogenrezeptor |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FSH | Follikelstimulierende Hormon |
| g | Gramm |
| GnRH-Analoga | gonadotropin releasing hormone factor-Analoga |
| GnRH | gonadotropin releasing hormone |
| HER2/neu | human epidermal growth factor receptor 2 |
| H₂O | Wasser |
| h | Stunden |
| HEPES-BSS | (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)- Buffer Saline Solution |
| INT | 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid |
| KCl | Kaliumchlorid |
| l | Liter |

| | |
|------------------------|--|
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LH | luteinisierende Hormon |
| MATA | Matairesinol |
| mg | Milligramm |
| MCF-7 | Mammakarzinomzelllinie |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| MTT | (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| mRNA | messenger RNA |
| nmol | Nanomol |
| nm | Nanometer |
| Na2HPO4 | Natriumhydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| PBS | phosphatgepufferte NaCl-Lösung |
| POD | Peroxidase |
| PPAR | peroxisomal proliferator-activated receptor |
| SECO | Secoisolariciresinol |
| SERM | selektiven Östrogenrezeptormodulatoren |
| SSRI | Serotonin-Wiederaufnahmehemmer |
| SHBG | sex hormone binding globulin |
| SDG | Secoisolariciresinol diglucosid |
| SiO₂ | Siliziumdioxid |
| TNS | Trypsin-Neutralisations-Solution |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |

Kapitel 1

Einleitung

Die Leinpflanze gilt als eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt. Sie findet bereits einen vielfältigen Einsatz in der Nahrungsmittel- und Gewebeproduktion und wird heutzutage besonders in Lebensmitteln eingesetzt [26] [42]. Zunehmend werden Naturstoffe weiterhin auf bioaktive Inhaltsstoffe untersucht, um die Möglichkeit des Einsatzes als Nahrungsergänzungsmittel oder Medikament zu diskutieren. Der Lein könnte zur Vorbeugung und Bekämpfung von Krebserkrankungen, wie zum Beispiel des Mammakarzinoms, aber auch von anderen Krebsarten, wie zum Beispiel des Endometrium- und des Prostatakarzinoms genutzt werden. Die Ernährung hat eine zunehmende Bedeutung in der Prävention von Karzinomen. Dies ist durch zahlreiche verschiedene Arbeitsgruppen bereits untersucht worden, unter anderem von Adlercreutz und Lamartiniere. [24] [61].



Abbildung 1.1: Leinfeld zur Blütezeit in Belgien [16]

Auch das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik in Rostock zeigte bereits einige Arbeiten, in denen die Wirkung der Leinpflanze auf insbesondere Mammakarzinomzellen, aber auch auf Chorion- und Endometriumkarzinomzellen untersucht worden ist. In den Ergebnissen

zeigen sich bereits wachstumshemmende Wirkungen der Leinpflanze auf die Krebszellen. Diese Wirkung scheint auch dosisabhängig zu sein [81] [78] [82].

Neben dem aus der Leinpflanze gewonnenen Leinsamen und dem Leinöl haben auch die weiteren Bestandteile dieser Pflanze eine zunehmende Bedeutung erlangt. Es können auch die Wurzel, der Stängel und die Blätter verarbeitet werden. In diesen Bestandteilen sind unter anderem die Lignane enthalten, welche vermutlich eine besondere Bedeutung bei der Bekämpfung der Mammakarzinomzellen haben. Lignane gehören zu den Phytoöstrogenen und zeigen phytoöstrogenartige Effekte auf Zellen. Die Wurzel zeigt in Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock (unter anderem von M. Szewczyk 2007) die besten Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung auf Mammakarzinomzellen und bildet somit die Grundlage für weitere Untersuchungen [81].

Für diese Arbeit wurde mit der Leinwurzel gearbeitet und eine östrogenpositive Mammakarzinomzelllinie (MCF-7) untersucht. In dieser Arbeit galt es im Besonderen herauszufinden, wie die Leinwurzel auf Mammakarzinomzellen wirkt und inwieweit sich diese Wirkung bei zusätzlicher Gabe von dem bekannten Wirkstoff Tamoxifen bei der Bekämpfung von hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen verstärken oder abschwächen könnte.

Als selektiver Östrogenrezeptormodulator ist Tamoxifen seit über 30 Jahren die bestuntersuchte Substanz zur Therapie des hormonsensiblen Mammakarzinoms.[57]

Gerade weil sich das Gesundheitsbewusstsein vieler Menschen geändert hat und gesunde Ernährung auch zur Vorbeugung von Krebserkrankungen in den Vordergrund gerückt ist, ist es wichtig, Produkte aus Naturstoffen wie in diesem Fall der Leinpflanze auf ihren Einfluss auch auf andere Medikamente hin zu untersuchen. Es stellt sich also die Frage, ob eine gleichzeitige Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt im klinischen Alltag sinnvoll ist.

1.1 Krebserkrankungen

1.1.1 Demographie und Epidemiologie von bösartigen Krebserkrankungen

Im Jahr 2009 starben laut dem statistischen Bundesamt in Deutschland insgesamt 216 128 Personen an einer Krebserkrankung. 116 711 davon waren Männer und 99 417 Frauen. Jeder vierte Todesfall war damit auf eine Krebserkrankung zurückzuführen. Der Lungen- und Bronchialkrebs war mit 42 221 Fällen die insgesamt am häufigsten aufgetretene Krebsart mit Todesfolge [21].

Bei den Männern war die häufigste Krebserkrankung mit Todesfolge der Lungen- und Bronchialkrebs in 29 133 Fällen (7,2 % aller Sterbefälle), gefolgt von einer Krebserkrankung der Prostata in 12 217 Fällen (3,0 %).

Bei den Frauen war die häufigste Krebstodesursache das Mammakarzinom mit 17 066 Fällen (3,8 %). Lungen- und Bronchialkrebs war mit 13 088 Fällen (2,9 %) bei den Frauen die zweithäufigste Todesursache.

Ein Viertel aller an Krebs verstorbenen Personen war jünger als 65 Jahre. Das durchschnittliche Sterbealter der an Krebs Erkrankten lag im Jahre 2009 bei 73,6 Jahren.

Im Jahr 2009 wurden bundesweit 1 496 089 an Krebs erkrankte Patientinnen (682 361) und Patienten (813 728) im Krankenhaus behandelt und entlassen [57] [21].

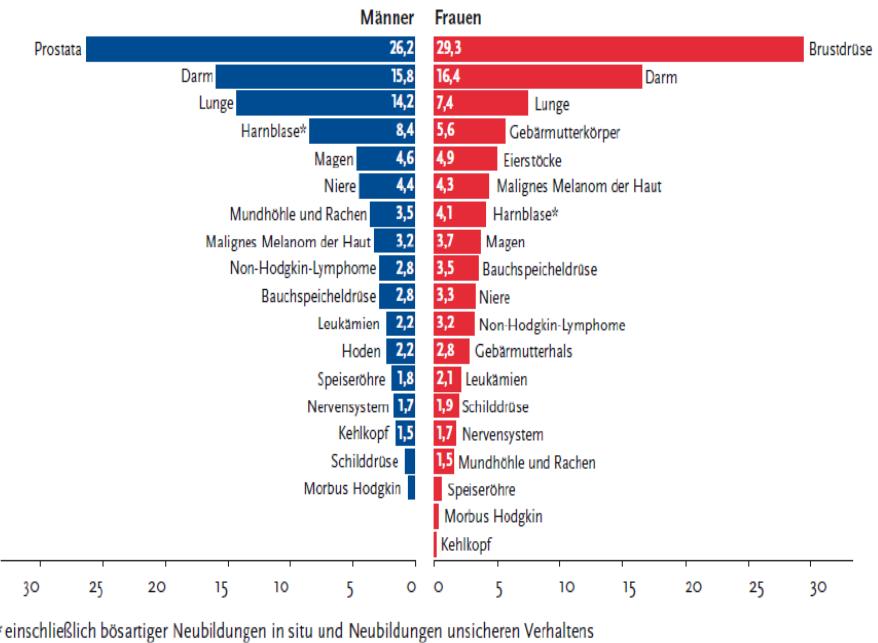


Abbildung 1.2: prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisierungen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006 [82].

1.1.2 Definition

Ein Tumor ist eine abnorm vergrößerte Masse an Gewebe. Es findet eine unkontrollierte Vermehrung der Zellen statt. Diese pathologische Gewebsneubildung unterscheidet sich von dem physiologischen Gewebe durch eine autonome und irreversibel gestörte Proliferation beziehungsweise eine verlängerte Lebensdauer der Tumorzellen. Die Entwicklung der Gewebsneubildung kann alle Organe oder Gewebe betreffen. Die Ursache ist in Abhängigkeit von der Lokalisation und dem Ursprungsgewebe vielfältig. Auch die Eigenschaften der Tumoren sind sehr unterschiedlich [52] [28].

1.2 Das Mammakarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit ist das Mammakarzinom der häufigste bösartige Tumor der Frau. Es sterben laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) (2009) weltweit jährlich etwa eine halbe Million Frauen daran. Im Vergleich zu den vorhergehenden Jahren ergab die Schätzung für das Jahr 2006 eine leichte Zunahme von Brustkrebsneuerkrankungen. Man kann aber nicht von einer realen Zunahme der Erkrankungshäufigkeit ausgehen. Viel mehr liegt dies unter anderem daran, dass zunehmend mehr bevölkerungsbezogene Krebsregister mit ihren Daten in die Schätzung eingehen [58]. Das mittlere Erkrankungsalter für die Entstehung eines Mammakarzinoms liegt bei circa 62 Jahren. Das Risiko einer Frau, irgendwann in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei circa 12 % [44]. Für das

Jahr 2006 gibt das Robert-Koch-Institut 57.970 Neuerkrankungsfälle des invasiven Brustkrebs an, was einen Anteil von 29,3 % aller weiblichen Krebserkrankungen ausmacht. Laut der amtlichen Todesursachenstatistik starben im Jahr 2007 insgesamt 16.780 Frauen aufgrund eines Mammakarzinoms. Der Anteil an der tumorbedingten Mortalität betrug 16,6 % (Statistisches Bundesamt 2007) [58].

1.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Es handelt sich beim Mammakarzinom um einen vom Epithel der Drüsentubuli oder den Milchgängen ausgehenden, bösartigen Tumor [57].

Für die Entstehung eines Mammakarzinoms werden eine Reihe von Risikofaktoren als Ursache verantwortlich gemacht. Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms ist das Alter. Die altersspezifische Inzidenz zwischen 50 und 70 Jahren liegt um den Faktor fünf höher als im Alter zwischen 35 und 40 Jahren. Bei 65-jährigen Frauen beispielsweise ist die Wahrscheinlichkeit dreimal höher, im nächsten Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken als bei einer 45-jährigen Frau [57]. Auch endogene Faktoren tragen zur Krebsentstehung bei. Etwa 5 % aller Mammakarzinome entstehen aufgrund einer erblichen Disposition [44]. Hat eine Frau eine Verwandte ersten Grades (Mutter oder Schwester) mit einem Mammakarzinom, so steigt ihr persönliches Risiko um den Faktor drei bis vier. Liegt eine Keimbahnmutation im BRCA-Gen vor, beträgt das Risiko bereits das sieben- bis achtfache einer familiär nicht belasteten Frau [57]. Das BRCA-Gen gehört zu den Tumorsuppressorgenen. So haben diese Frauen ein lebenslanges Risiko von 50–80 %, an einem Mammakarzinom, von 60 %, an einem kontralateralen Mammakarzinom und von 10–40 %, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [44].

Wenn eine Frau bereits an einem Mammakarzinom erkrankt war, hat sie ein fünffach erhöhtes Risiko, erneut an einem Mammakarzinom zu erkranken. Neben diesen endogenen Faktoren spielen auch weitere Risikofaktoren eine Rolle wie Übergewicht, frühe Menarche, späte Menopause, Hormonsubstitution, Zugehörigkeit zu höheren sozioökonomischen Klassen (längere Ausbildungszeiten und spätere erste Schwangerschaft), eine westliche Lebensweise (wenig Bewegung, falsche Essgewohnheiten, vor allem ein hoher Konsum tierischer Fette), Nulliparität und die Länge der Stillperiode.

Radioaktive Strahlung kann ebenfalls ein Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms sein [57].

1.2.3 Medikamentöse Therapie des Mammakarzinoms

Mammakarzinompatienten werden generell in drei Risikogruppen eingeteilt. Patienten ohne befallene Lymphknoten gehören zur Niedrigrisikogruppe. Für diese Gruppe ist keine Chemotherapie indiziert, sondern die alleinige operative Therapie ausreichend.

Die mittlere Risikogruppe umfasst nodalnegative Hochrisikopatienten als auch Patienten mit 1–3 befallenen Lymphknoten ohne die Überexpression von human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu). HER2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und stimuliert die Zellproliferation und hemmt den programmierten Zelltod.

Zur Hochrisikogruppe gehören alle Frauen mit mehr als 3 befallenen Lymphknoten sowie alle Patientinnen mit 1–3 befallenen Lymphknoten und einer bestehenden Überexpression von HER2/neu. Es ist obligat, dass alle Frauen mit 4 und mehr befallenen Lymphknoten eine

Chemotherapie erhalten sollten. Bei positivem Hormonrezeptorstatus sollte eine chemoendokrine Therapie erfolgen. [57].

Eine adjuvante Chemotherapie ist ein fester Bestandteil in der Therapie des Mammakarzinoms. Nur bei Patientinnen mit einem niedrigen Risiko kann darauf verzichtet werden. Bei schwacher bis mäßiger Expression des Hormonrezeptors stellt die kombinierte chemoendokrine Therapie den Goldstandard dar. Bei hochhormonrezeptorpositiven Patientinnen mit einer mittleren Risikokonstellation wird diskutiert, ob sogar die alleinige Gabe einer hormonellen Therapie eine gute Alternative zur Chemotherapie bedeuten könnte. Der Nutzen der Chemotherapie ist bei prämenopausalen Patientinnen stärker als in der Postmenopause. Bei der Therapie mit Anthrazyklinen und Tamoxifen zeigen junge Frauen eine 57%ige Reduzierung des Mortalitätsrisikos, während ältere Frauen eine Reduzierung um 45 % im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe anzeigen [57].

1.2.4 Endokrine Therapie des Mammakarzinoms

Endokrine Therapie bedeutet im Wesentlichen die antihormonelle Therapie des Mammakarzinoms. Mammakarzinome haben Rezeptoren für Östrogene und Progesteron und wenn eine Krebszelle diese Rezeptoren hat, so wird das Wachstum dieser Zelle durch Östrogene gefördert. Die endokrine Therapie verhindert diese Wirkung an den Tumorzellen.

Nach abgeschlossener operativer Behandlung des Mammakarzinoms muss davon ausgegangen werden, dass zum Teil noch lokale Lymphknotenmetastasen beziehungsweise Fernmetastasen vorhanden sein können. Die Prognose ist entscheidend von der Fernmetastasierung abhängig. Die adjuvante Therapie findet deshalb bei fast allen Patienten Anwendung [57].

Mittlerweile hat sich die endokrine Therapie bei der Behandlung des Mammakarzinoms etabliert. In den 60er Jahren zeigte sich erstmals durch die Entdeckung des Östrogenrezeptors der endokrine Einfluss in der Therapie bei Mammakarzinomen. Erst wurden Maßnahmen wie eine Ovarektomie durchgeführt, aber mittlerweile stehen heute auch medikamentöse Therapien zur Verfügung [49]. Es lassen sich heute verschiedene endokrinologische Therapien beim Mammakarzinom finden: die Ovarektomie, die strahlentherapeutische Induktion, die medikamentöse Kastration mit gonadotropin releasing hormone factor-Analoga (GnRH-Analoga), Tamoxifen, Aromatasehemmer und GnRH-Analoga in Kombination mit Tamoxifen (und/oder Chemotherapie) [57]. GnRH-Analoga sind synthetische Analoga des Neurohormons gonadotropin releasing hormone (GnRH). GnRH-Analoga führen zur Überstimulation der Hormonfreisetzung und hemmen dadurch langfristig die Hormonfreisetzung [15]. Die Aromatase ist ein Enzym, das die Umwandlung von Testosteron zu Östradiol und von Androstendion zu Östron katalysiert [64].

Metaanalysen haben gezeigt, dass eine Ovarektomie bei prämenopausalen Patientinnen mit Mammakarzinom unabhängig vom Lymphknotenstatus zu einer besseren Prognose führt. Es werden heute routinemäßig schon die Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Dies sind unter anderem die wichtigsten prognostischen Faktoren. Nur beim Nachweis dieser Rezeptoren lassen sich die oben genannten Therapien anwenden [57] [49].

1.2.5 Tamoxifen

Mehrere prospektive randomisierte Studien haben gezeigt, dass die präventive Gabe von Tamoxifen bei Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko das Auftreten von Mammakarzinomen um 38 % reduzieren kann. Eine Blockade der Östrogenwirkung durch Tamoxifen wird in der ad-

juvanten beziehungsweise palliativen Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome genutzt. Es wird auch effizient das Auftreten von Zweitkarzinomen verhindert [57].

Tamoxifen gehört zu den selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) und führt über eine kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor zu einer Wachstumshemmung hormonabhängiger Tumorzellen [64]. Außerdem bewirkt Tamoxifen eine Reduktion der Produktion von östrogenabhängigen Proteasen und eine Reduktion von Wachstumsfaktoren. Es wird außerdem ein Zusammenhang mit der Interaktion bei der Angiogenese vermutet. Es liegen deutlich mehr Daten zur Therapie mit Tamoxifen bei postmenopausalen Mammakarzinompatienten als bei prämenopausalen vor. Wenn man Tamoxifen mit einer Chemotherapie vergleicht, so ist die endokrine Therapie bei Frauen über 50 Jahren und bei östrogenrezeptorpositiven Tumoren der alleinigen Chemotherapie gegenüber signifikant überlegen. Tamoxifen wirkt auch auf gesunde Zellen. Dadurch wird die Wachstumsaktivität eingeschränkt. Das abnormale Wachstum und die Krebsentstehung wird so möglichweise gestoppt [81].

Damit das Tamoxifen wirken kann, muss es erst in seine wirksame Form, Endoxifen und 4-Hydroxy-Tamoxifen umgewandelt werden. Diese beiden Substanzen binden stärker an den Östrogen-Rezeptor. Tamoxifen kann man also als Pro-Drug bezeichnen. Die Umwandlung in therapeutisch wirksame Metabolite erfolgt durch das Enzym CYP2D6 (siehe Abb. 1.3) [7].

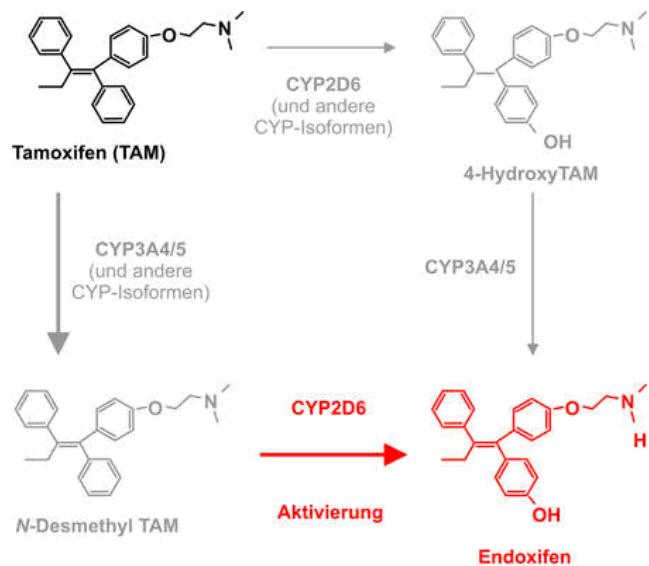


Abbildung 1.3: Metabolisierung von Tamoxifen [7].

Die allgemeine Standarddosis in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms beträgt 20 Milligramm (mg) Tamoxifen täglich über einen Zeitraum von insgesamt fünf Jahren. Die fünfjährige Gabe ist einer Therapie von zwei bis drei Jahren signifikant überlegen. Eine Therapie von mehr als fünf Jahren wird aufgrund der Nebenwirkungen nicht empfohlen. Der Effekt von Tamoxifen ist unabhängig vom Alter der Patientinnen, dem Nodalstatus oder der begleitenden Chemotherapie [57]. Es wurden weitere Antiöstrogene, unter anderem Raloxifen und Toremifene entwickelt. Bisher zeigt sich jedoch kein Vorteil dieser Medikamente gegenüber Tamoxifen [57] [87] [46] [27].

Unter langjähriger Tamoxifentherapie muss jedoch beachtet werden, dass auch Neben-

wirkungen auftreten können. In einer Studie von Mossa, B. et al. 2005 wurde eine höhere Inzidenz von pathologischen Endometriumveränderungen bei postmenopausalen mit Tamoxifen behandelten Patienten zwischen dem dritten und fünften Jahr der Behandlung gefunden [65].

Weitere mögliche Nebenwirkungen sind Hitzewallungen, Zyklusstörungen, Ausfluss sowie thromboembolische Folgen [2].

1.3 Hormonrezeptor

Hormone haben in der Regel charakteristische Erfolgsorgane. Für die Wirkung eines Hormons am Erfolgsorgan ist ein spezifischer Rezeptor notwendig. Rezeptoren sind Proteine, an die die spezifischen Hormone binden. Dadurch wird die Hormonwirkung vermittelt.

Die Rezeptoren zeigen in der Regel bestimmte Eigenschaften. Sie haben eine hohe Spezifität, eine geringe Kapazität sowie eine hohe Affinität. Hydrophile Hormone binden an Rezeptoren der Zellmembran. Lipophile Hormone durchdringen die Zellmembran und binden an hochspezifische, lösliche intrazelluläre Rezeptoren. Dieser Rezeptor ändert daraufhin seine Konformation. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex bindet an die Desoxyribonucleinsäure (DNA). Dann wird die Transkription spezifischer DNA-Sequenzen angeregt. Nun erfolgt über die gebildete messenger RNA (mRNA) die Proteinbiosynthese. Dadurch kommt es zur Hormonwirkung [53]. Die Östrogenrezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und die Wirkung wird über heterotrimere G-Proteine vermittelt. Ein G-Protein ist aus drei Untereinheiten (α , β und γ) aufgebaut [64] [79].

Die Östrogenrezeptoren gehören zu einer großen Familie von Proteinen. Die Östrogenrezeptoren besitzen alle einen ähnlichen Wirkmechanismus. Für das Steroidhormon Östradiol gibt es zwei spezifische intrazelluläre Rezeptoren: Östrogenrezeptor (ER) α und der ER β , die jeweils aus 5 funktionellen Domänen bestehen (siehe Abb. 1.4). Der ER α wird als klassischer Östrogenrezeptor bezeichnet und enthält 595 Aminosäuren mit einer zentralen DNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen Hormon-bindenden Domäne. Der ER β enthält nur 530 Aminosäuren. Beide Rezeptoren weisen jedoch einen hohen Grad an Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz auf. In der DNA-bindenden Domäne sind sich beide Rezeptortypen in etwa 97 % ähnlich. In der Liganden-bindenden Domäne sind sie nur zu circa 59 % homolog.

Das pflanzliche Östrogen (Phytoöstrogen) Genistein bindet selektiv an den ER β [64].

Auch die Expression der beiden Hormonrezeptoren unterscheidet sich in den unterschiedlichen Geweben. Der ER α findet sich vor allem im Endometrium, in den Stromazellen des Ovars und in den Mammakarzinomzellen. Der ER β befindet sich vor allem in den Granulosazellen, in den Spermatiden, in den Nieren, in der Darmmukosa, im Leberparenchym, im Knochenmark, im Gehirn, in den Endothelzellen und in der Prostata.

Für Progesteron gibt es den Progesteronrezeptor, ein Protein mit 930 Aminosäuren. Es besteht auch eine ausgeprägte Homologie zwischen Östradiol- und Progesteronrezeptoren [64].

Die quantitative Bestimmung all dieser genannten Rezeptoren ist Grundlage für die wichtige Entscheidung, ob eine endokrine Behandlung des Mammakarzinoms erfolgen sollte. Es gibt Wirkstoffe, die nach Bindung an den Hormonrezeptoren keinen Signalübertragungsweg in Gang setzen, diese werden auch als Antagonisten bezeichnet. Dies sind wie bereits beschrieben das Tamoxifen oder das Raloxifen. Tamoxifen bindet an die gleiche Stelle wie das Östradiol. Es bindet in die Vertiefung, die normalerweise vom Östrogen besetzt wird und somit wird die normale Konformationsänderung des Rezeptors nicht durchgeführt. Dadurch werden auch die

Bindung von Coaktivatoren und somit die Aktivierung der Genexpression verhindert [53] [64] [79].

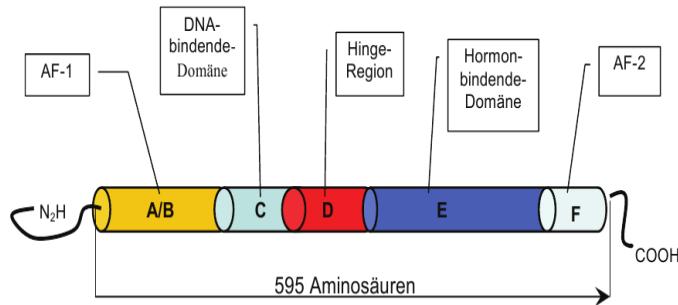


Abbildung 1.4: Aufbau des Östrogenrezeptors α [64].

1.4 Steroidhormone

Steroidhormone bilden in etwa 15 % aller im Körper vorkommenden Hormone [82]. Sie werden in fünf Gruppen eingeteilt: Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene, Östrogene und Gestagene, abhängig davon, welche Struktur sie haben und an welchen Rezeptor sie binden.

Sie haben einen Einfluss auf den Zellstoffwechsel, das Energiegleichgewicht, das Verhalten, die Immunantwort und den Elektrolyt- und Wasserhaushalt und auf die Reproduktion [64].

Die Synthese der Glukokortikoide und der Androge wird durch das Hypothalamus-Hypophysensystem gesteuert. Die Hormone sind Abkömmlinge des Cholesterins und besitzen wie das Cholesterin selbst ein Sterangerüst. Deshalb bezeichnet man sie auch als Steran-Derivate. Das Cholesterin wird in der Leber gebildet, aber auch zu einem geringen Anteil in den hormonbildenden Zellen selbst. Der erste Schritt der Steroidsynthese ist die Umwandlung des Cholesterins zu Pregnenolon. Pregnenolon ist ein schwach wirksames Gestagen und hat progesteron-ähnliche Wirkung. Von dem Pregnenolon erfolgt die weitere Synthese der verschiedenen Steroidhormone. Das Pregnenolon stellt somit die letzte gemeinsame Vorstufe der Steroide dar (siehe Abb. 1.5).

Die verschiedenen Steroidhormone zählen zu den lipophilen Hormonen, das heißt, sie können leicht durch die Zellmembranen permeieren. Die Synthese der Steroidhormone erfolgt in den entsprechenden Drüsen, meist in der Nebennierenrinde, in den Keimdrüsen und im zentralen Nervensystem. Die Hormone werden nicht in den Drüsen gespeichert, sondern im Blut an Proteine gebunden und gelangen so schließlich zu ihrem Zielort. Im Zytosol der Zelle befindet sich ein löslicher Hormonrezeptor, an den das lipophile Hormon dann bindet. Dieser aktive Hormon-Rezeptor-Komplex gelangt in den Zellkern und aktiviert dort die Genexpression.

Der Wirkmechanismus der lipophilen Hormone besteht in der langfristigen Änderung der Enzymsynthese. Die Expression der Enzyme wird verändert. Lipophile Hormone werden schließlich in der Leber inaktiviert und über die Niere und den Darm ausgeschieden [59] [53] [64].

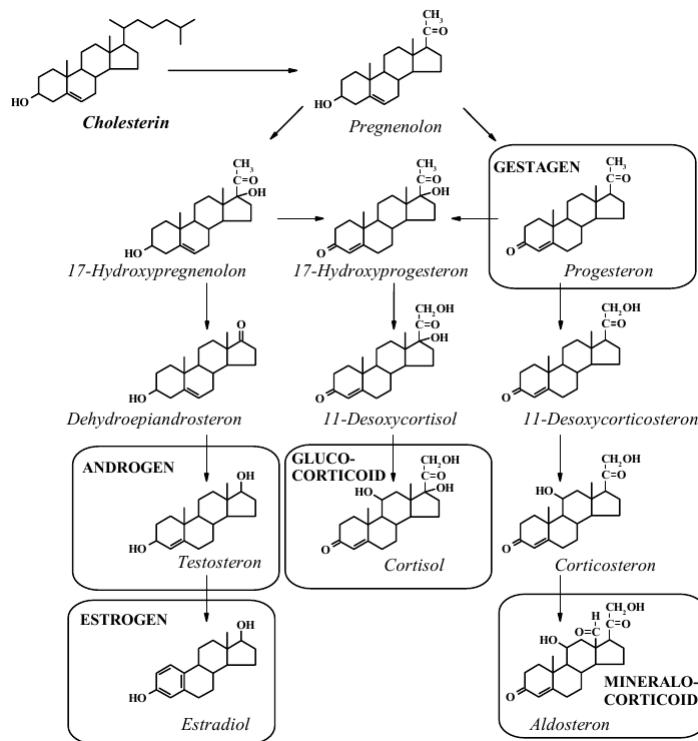


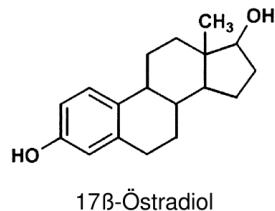
Abbildung 1.5: Übersicht der letzten Stufen der Steroidsynthese [56].

1.5 Östrogene

Östrogene sind Steroide, die im Ovar und in den Theka-Zellen des Graaf-Follikels, aber auch in geringer Menge in den Testes und in der Nebennierenrinde produziert werden, unter dem Einfluss von LH und FSH [15] [59].

Das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH) sind Sexualhormone, die für die Reifung und Produktion der Geschlechtszellen in beiden Geschlechtern zuständig sind [15]. Während einer Schwangerschaft ist auch die Plazenta an der Östrogenproduktion beteiligt.

Die Biosynthese der Östrogene verläuft über die Zwischenstufen der Androgene (Testosteron und Aldosteron). Entscheidend ist die Umwandlung des Testosterons in Östradiol beziehungsweise des Androstendriols in Östron durch den Cytochrom P450-Aromatase-Komplex (CYP450). Von den Androgenen unterscheiden sich die Östrogene durch das Fehlen der C19-Methylgruppe, durch den Besitz einer Hydroxylgruppe an C3 und durch die Aromatisierung des Ringes A [64] (siehe Abb 1.6).

Körpereigenes Steroidhormon:Abbildung 1.6: Strukturformel des 17 β Östrogens [60].

Die Östrogene werden im Blut an Proteine gebunden und binden am Wirkungsort an Östrogenrezeptoren und werden durch das Zytosol zum Zellkern gebracht. Dort beeinflussen sie die Proteinbiosynthese. Die Ausscheidung erfolgt über die Niere nach Konjugation mit Glucuronsäure. Die wichtigsten natürlichen Vertreter der Östrogene sind Östron, Östriol und das Östradiol [15] [59] [64].

1.5.1 Wirkung der Östrogene

Die Östrogene sind verantwortlich für das Wachstum der weiblichen Fortpflanzungsorgane und die Ausbildung sekundär weiblicher Geschlechtsmerkmale. Sie steuern den weiblichen Menstruationszyklus und gegebenenfalls die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Weitere Wirkungen sind eine vermehrte Proliferation des Endometriums, das heißt die Muskelfasern nehmen an Zahl und Größe zu, eine vermehrte Durchblutung des Endometriums, die Bildung spinnbaren Zervixschleims sowie ein zyklischer Einfluss auf das Vaginalepithel.

Östrogene wirken jedoch auch auf den Fettstoffwechsel und auf den Knochenstoffwechsel [57].

Es sind mittlerweile eine ganze Zahl von synthetischen Östrogenen und Progesteronen verfügbar. Sie werden zum Beispiel zur Hormonsubstitution nach der Menopause oder zur Antikonzeption eingesetzt. Die verantwortlichen Mechanismen für die Entstehung eines Mammarkarzinoms sind noch nicht eindeutig aufgeklärt. Zahlreiche prospektive Studien haben gezeigt, dass die Höhe der endogenen Östrogenspiegel mit einem späteren Brustkrebsrisiko korreliert. Eine frühzeitige Ovarektomie reduziert das Brustkrebsrisiko [57].

Östrogene sind auch typische Tumorpromotoren. Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren stimulieren Östrogene die Transkription von Proliferationsgenen [59] [64] [79]. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten spontaner Replikationsfehler steigt mit jedem neuen DNA-Synthesezyklus. Nach einer bestimmten Zahl von Mutationen kann dies zu einer malignen Transformation führen .

Eine andere Hypothese besagt, dass Östrogene in genotoxische Metaboliten umgewandelt werden. Diese können dann direkt die DNA schädigen. Östrogene könnte man deshalb auch als Tumorinitiatoren oder Mutagene bezeichnen. Es erfolgt laut dieser Hypothese die Umwandlung von Östradiol in das Catecholöstragen 4-Hydroxyöstradiol durch das CYP450 1B1. Dies wird in das Östradiol-3,4-Chinon umgewandelt, welches kovalent an Guanin oder Adenin bindet. Diese Purine können somit aus der DNA herausgebrochen werden. Dadurch kommt es zu Einzelstrangbrüchen und Punktmutationen. Eine zu hohe Anzahl dieser Schäden kann zu einer Überlastung der Reparatursysteme und somit möglicherweise zu Mutationen führen. Infolgedessen kann es zur malignen Transformation kommen (siehe Abbildung 1.7) [87] [89] [47] [57].

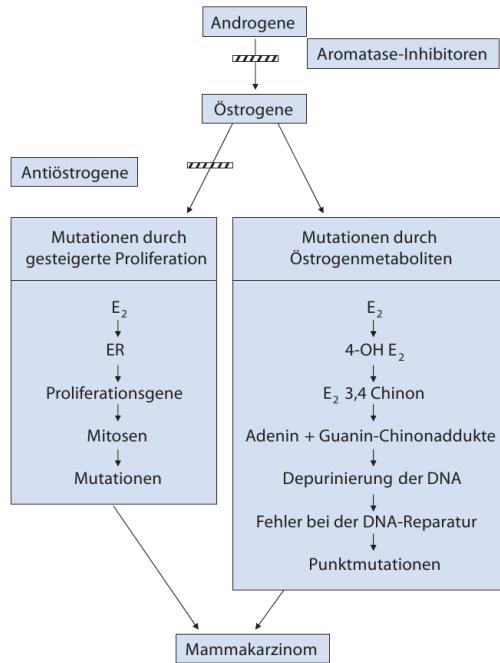


Abbildung 1.7: Karzinogenese des Mammakarzinoms [57].

Kommentar zur Abbildung 1.7: Hypothetische Mechanismen, über die Östrogene Brustkrebs verursachen könnten. Antiöstrogene blockieren nur den Mechanismus über den Östrogenrezeptor (links), während Aromatasehemmer zusätzlich die Bildung von genotoxischen Metaboliten unterdrücken [57].

1.5.2 Bedeutung der Östrogene

Es ist inzwischen allgemein bekannt, dass Östrogene zur Entstehung von Mammakarzinomen beitragen können. Mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms sind eine frühe Menarche, eine späte Menopause, eine hohe Dichte des Drüsenkörpers, eine hohe Knochendichte und Gewichtszunahme in der Perimenopause assoziiert. Diese klinischen

Parameter zeigen eine verlängerte Exposition gegenüber körpereigenen Östrogenen an. Die Höhe der endogenen Östrogenspiegel korreliert mit dem Risiko, an Brustkrebs zu erkranken [57].

1.6 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen. Nach Caragay (1992) lassen sich die sekundären Pflanzenwirkstoffe allgemein in 14 Klassen einteilen: Sulfide, Phytate, Flavonoide, Glicosinolate, Carotinoide, Cumarine, Monoterpenoide, Triterpene, Lignane, phenolische Säuren, Indole, Isothiocyanate, Phtalide und Poline [36].

Eine gemeinsame biologische Eigenschaft aller Phytoöstrogene ist die östrogene Aktivität. Diese hat zur Namensgebung geführt. Phytoöstrogene wirken im Körper ähnlich wie das 17β -Östradiol. Sie können dessen Wirkung im menschlichen Organismus imitieren. Man bezeichnet die Phytoöstrogene auch als SERM. Es wird angenommen, dass besonders die bei beiden vorhandene phenolische Gruppe für diese gleichartige Wirkung verantwortlich ist. Vergleicht man die Phytoöstrogene mit 17β -Östradiol, dann ist ihre östrogene Wirkung mindestens um den Faktor 100 oder sogar um den Faktor 1000 bis 10000 mal geringer. Phytoöstrogene können aber im Körper auch in einer 100- bis 10000fach höheren Konzentration als die endogenen Östrogene vorkommen [60]. Phytoöstrogene können an den Östrogenrezeptor binden und zeigen allgemein eine höhere Affinität zum ER β . Phytoöstrogene sollen dabei in niedrigen Konzentrationen eher östrogen wirken und in höheren Konzentrationen das Tumorzellwachstum hemmen [85] [33].

Phytoöstrogene sind Polyphenole. Sie lassen sich in drei Substanzklassen einordnen: die Isoflavone, die Lignane und die Coumestane [91].

Zu den Lignanen gehören das SECO und das MATA. Weitere Lignane sind das Pinoresinol, Lariciresinol und Syringaresinol.

Die Samen der Leinpflanze gelten als reichste Quelle der Lignane. Vollkorn ist ebenfalls eine Hauptquelle. Weiterhin sind die Lignane in Oliven, Erdnüssen, Sonnenblumen und Sesam, aber auch in Birnen, Äpfeln und Karotten enthalten [78] [60] (siehe Tabelle.1.1).

Lignane bestehen aus zwei Phenyl-propan-Einheiten, die miteinander verknüpft sind. Sie weisen durch zusätzliche Brücken über Sauerstoffatome oder Kohlenstoffverbindungen eine Vielfalt in der Struktur auf. Abbildung 1.8 zeigt die Struktur der verschiedenen Lignane.

SECO und MATA werden vom Darmepithel in körpereigene Lignane umgewandelt. Diese dann entstehenden Metabolite sind das Enterolacton und das Enterodiol. Diese werden auch als sogenannte Säugerlignane bezeichnet. Abbildung 1.9 zeigt die Produktion von Enterolacton und Enterodiol. Enterodiol und Enterolacton sind biologisch aktiver als ihre Vorläufer SECO und MATA [22].

Zu den Isoflavonen gehören das Daidzein, Glycitein und das Genistein. Weitere Isoflavone sind Formononetin und Biochanin A. Dies sind die 4'-Methylether von Daidzein und Genistein. Abbildung 1.10 zeigt die Strukturformeln der wichtigsten Isoflavone. Abbildung 1.11 zeigt die Ähnlichkeit zwischen der Struktur des Östrogens und der Isoflavone.

Sie werden von Pflanzen bei bakterieller Exposition synthetisiert. Isoflavone unterscheiden sich als 3-Phenylchromonderivate von den Flavonen nur durch die Position der Verknüpfung von dem Chromon- und Phenylring. Die reichsten Quellen an Isoflavonen sind Sojaprodukte wie zum Beispiel Tofu, das die drei Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein im Verhältnis 10 : 8 : 1 enthält. Daidzein und Genistein werden im menschlichen Organismus mithilfe der

Tabelle 1.1: Gehalt an Secoisolariciresinol und Matairesinol als wichtige Vertreter der Lignane in ausgewählten Lebensmitteln ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Trockengewicht)[60].

| Lebensmittel | Secoisolariciresinol | Matairesinol |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|
| Leinsamen | 370000 | 1100 |
| Kürbiskerne | 21400 | n.b. |
| Roggen | 47-720 | 65 |
| Weizen | 8-280 | n.n. |
| Reis | 16-60 | n.n. |
| Nüsse * | 96-257 | 0-6 |
| Bohnen * | 64-3050 | n.n. bis Spuren |
| Spargel | 6510 | n.b. |
| Zwiebeln | 83 | 8 |
| Broccoli | 414 | 23 |
| Karotten | 192 | 3 |
| Kartoffeln | 10 | 6 |
| Weißwein, $\mu\text{g}/\text{l}$ | 135-174 | 17-22 |
| Rotwein, $\mu\text{g}/\text{l}$ | 686-1280 | 74-98 |

intestinalen Flora in die Metabolite Equol und O-Desmethylangolensin umgewandelt [85] [26] [29] [60]. Tabelle 1.2 zeigt den Gehalt an Isoflavonen in verschiedenen Lebensmitteln.

Tabelle 1.2: Gehalt an verschiedenen Vertretern der Isoflavone in ausgewählten Lebensmitteln ($\text{mg}/100 \text{ g}$ Frischgewicht)[60].

| Lebensmittel | Genistein | Daidzein | Glycitein | Biochanin A | Formononetin |
|--------------|-----------|----------|-----------|-------------|--------------|
| Sojabohnen | 30-92 | 20-52 | 10-14 | 0,01 | 0,07 |
| Sojamilche | 3-17 | 1-13 | 0-2 | n.n. | n.n. |
| Tofu | 8-20 | 7-11 | 0-5 | n.n. | n.n. |
| Sojasprossen | 2,0 | 2,5 | n.b. | n.n. | 0-0,2 |
| Kleesprossen | 0,1-0,4 | 0-0,1 | n.b. | 0,4-0,8 | 2,3-4,0 |
| Bohnen* | 0-0,7 | 0-0-02 | n.n. | 0-1,4 | 0-0,2 |
| Erbsen* | 0-0,6 | 0-7,3 | n.n. | n.n. | n.n. |
| Obst, Gemüse | 0-0,2 | 0-0,2 | n.n. | n.n. | n.n. |

Kommentar zu den Tabellen 1.1 und 1.2: * verschiedene Sorten; n.n. unter der Nachweisgrenze; n.b. nicht bestimmt

In der Pflanze liegen Isoflavone als Zuckerkonjugate vor. Diese sind hitzelabil. Es liegen in den wärmebehandelten Produkten somit die 6'-O-Acetyl-7- β -Glucoside und die 7- β -Glucoside vor. In der Sojabohne liegen eher die 6'-O-Malonyl-7- β -Glucoside vor. In traditionell ferment-

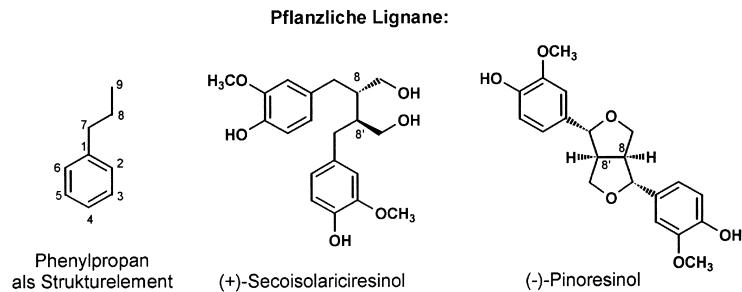


Abbildung 1.8: Strukturformeln der wichtigsten Lignane [60].

tierten Sojaprodukten wie Miso überwiegen die Aglykone. Hier ist der Zuckerrest durch die zur Fermentation eingesetzten Mikroorganismen enzymatisch abgespalten.

Coumestane spielen in der Ernährung des Menschen eine eher untergeordnete Rolle. Zu den Coumestanen gehört das Coumestrol, welches von allen genannten Phytoöstrogenen die höchste östrogene Aktivität besitzt. Es ist vor allem in Brokkoli, Spinat und Alfalfa-Sprossen enthalten [60]. Abbildung 1.12 zeigt die Strukturformeln der wichtigsten Coumestane.

1.6.1 Stoffwechsel der Phytoöstrogene

Wenn Isoflavone als Aglykone aufgenommen werden, erfolgt im Dünndarm eine Resorption durch passive Diffusion aufgrund der bestehenden Lipophilie. Wenn die Glucosidform vorliegt, werden mehrere Resorptionswege möglich. Diese sind jedoch im Einzelnen noch unklar. Es erfolgt eine Abspaltung des Zuckerrestes durch dünndarmeigene zytosolische Glucosidasen. Außerdem wird ein aktiver Transport über spezifische Glucosetransporter diskutiert. Isoflavone, die nicht resorbiert wurden, gelangen in den Dickdarm. Nun können sie in der Darmflora metabolisiert werden. Zum Beispiel wird Daidzein zuerst zu Dihydrodaidzein reduziert. Dieses wird dann durch Spaltung des C-Ringes zu O-Demethylangolensin oder unter Erhalt des C-Ringes zu dem Isoflavan Equol umgewandelt. Die Bildung von Equol ist individuell stark unterschiedlich und von der Darmflora stark abhängig. Eine zu hohe Fettzufuhr mit der Nahrung, wie sie eher in westlichen Ländern üblich ist, wirkt sich negativ auf die Equol-Metabolisierung aus. Die Isoflavone und die gebildeten Metabolite gelangen dann über die Pfortader zur Leber. Dort erfolgt die Phase-II-Konjugationsreaktion. Es entstehen hauptsächlich Monoglucuronide. Die Ausscheidung erfolgt über die Leber, jedoch zum größten Teil aber über die Niere. Die Isoflavone unterliegen aber auch einem enterohepatischen Kreislauf. [60] Wenn die Konjugate mit der Galle in den Darm gelangen, können sie durch die Darmflora gespalten werden und diese Aglykone können dann erneut aufgenommen werden.

Bei Asiatinnen liegt die Plasma-Gesamtflavonoidkonzentration etwa im Mittel bei 870

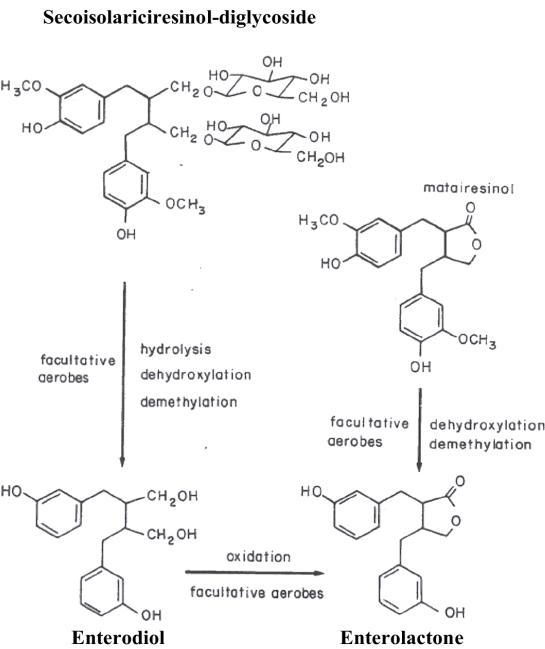


Abbildung 1.9: Produktion von Enterodiol und Enterolacton aus SECO und MATA [84]

Nanomol (nmol). Bei Europäern liegt sie sogar nur bei im Mittel um 50 nM. Diese Spiegel sagen aber nicht automatisch etwas über die Konzentration im Gewebe aus. In einer Studie zur Bioverfügbarkeit an Ratten erfolgt die Gabe von radioaktiv markiertem Genistein. Es zeigte sich in den Geweben wie Brust, Eierstöcken, Uterus und Prostata eine erhöhte Konzentration der Aglycone, also der wirksamen Form der Isoflavone, während im Plasma nur ein geringer Anteil zu finden war. Die Lignane Secoisolariciresinol-diglucosid und Matairesinol werden durch die Darmflora fast vollständig in Enterodiol und Enterolacton umgewandelt, die auch als Säuger lignane bezeichnet werden. In Lebermikrosomen von Ratten und Menschen konnte der oxidative Metabolismus der Säuger lignane durch Cytochrom-P450-Enzyme in vitro nachgewiesen werden. Es ist jedoch noch nicht klar, inwieweit dies auf in vivo-Bedingungen übertragbar ist. Interessanterweise sind die Konzentrationen der Enterolactone von Asiaten und Europäern ähnlich und betragen Werte zwischen 10–40 nM [60] [69].

1.6.2 Bedeutung der Phytoöstrogene

In den letzten 3 Jahrzehnten nahm das Interesse an der Rolle der Phytoöstrogene in der Forschung und deren Anwendung im klinischen Alltag zu [26].

Der Gehalt an Phytoöstrogenen in Pflanzen zeigt eine erhebliche Variabilität. Das Isoflavonoid Genistein zum Beispiel wird vom Menschen vor allem durch Sojaprodukte aufgenommen. Coumestrol (in Alfalfa und Klee) zeigt bei Ratten, Mäusen und Fischen typische dosisabhängige östrogenartige Effekte. Bei den Isoflavonoiden liegt die relative Potenz bei drei bis fünf Größenordnungen unter der von 17β -Östradiol. Neben östrogenen Effekten kann Genistein auch das Wachstum verschiedener Tumorarten hemmen [57].

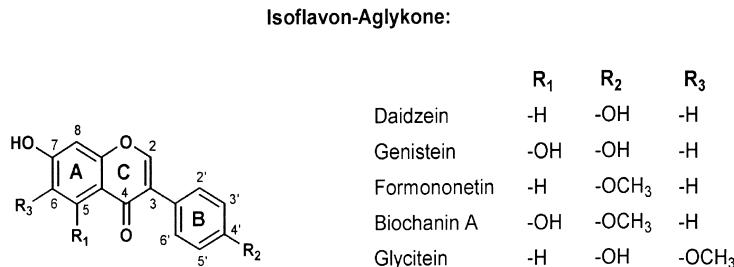


Abbildung 1.10: Strukturformeln der wichtigsten Isoflavone [60].

Die Behandlung neugeborener Mäuse mit Genistein verzögerte das Ansprechen auf eine chemische Induktion von Mammakarzinomen [61]. Es werden verschiedene Mechanismen dafür verantwortlich gemacht, unter anderem auch die antiöstrogene Wirkung. In internationalen Krebsstatistiken zeigt sich, dass hormonabhängige Krebserkrankungen wie Brust- und Prostatakrebs in asiatischen Ländern viel seltener auftreten [60]. Die Ernährungsweise der verschiedenen Länder ist sehr unterschiedlich, weshalb man davon ausgehen muss, dass viele Faktoren zu diesen Unterschieden beitragen. Dies hängt allerdings auch mit der asiatischen Ernährungsweise zusammen, die im Vergleich zur westlichen Diät auch weniger Fett (und damit weniger bioakkumulierende persistente Xenoöstrogene wie zum Beispiel DDT) enthält. Weiterhin werden traditionellerweise Gemüse und Pflanzenprodukte verwendet, die reich an natürlichen Antioxidantien und an Phytoöstrogenen (zum Beispiel Genistein aus Sojaprodukten) oder essentiellen Spurenelementen sind [43]. Der Unterschied von Xenoöstrogenen in Fetten und Phytoöstrogenen liegt auch in der Biopersistenz. Es gibt keinen Hinweis, dass Phytoöstrogene im Gegensatz zu Xenoöstrogenen in Körnergeweben akkumulieren [57].

Bradlow et al. 1995 untersuchte den Einfluss von Phytoöstrogenen auf den Östradiolmetabolismus [32]. Hauptmetabolite des Östrogenstoffwechsels sind das 2-OHE1 (2-Hydroxyöstron) und das 16- α -OHE1 (16- α -Hydroxyöstron). Vor allem das 16- α -Hydroxyöstron bindet kovalent an Östrogenrezeptoren, wodurch eine östrogene Wirkung entsteht. 2-Hydroxyöstron hingegen zeigt nahezu keine Östrogenwirkung. Ein erhöhtes Risiko, an östrogenabhängigen Tumoren wie Brustkrebs und anderen gynäkologischen Malignomen zu erkranken, ist daher mit einem erhöhten Vorkommen von 16- α -OHE1 assoziiert [8]. Es zeigte sich bei den Arbeiten von Bradlow et al. eine durch Phytoöstrogene verursachte Reduktion des genotoxischen 16- α -Hydroxyöstron zugunsten des 2-Hydroxyöstron. Bisher von Bradlow et al. untersuchte Karzinogene, Onkogene und Tumorviren haben das Verhältnis der Metaboliten in Richtung 16- α -Hydroxyöstron verschoben [32].

Es konnte in weiteren Fall-Kontroll-Studien gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von Phytoöstrogenen im Plasma mit einem verringerten Brustkrebsrisiko korrelieren.

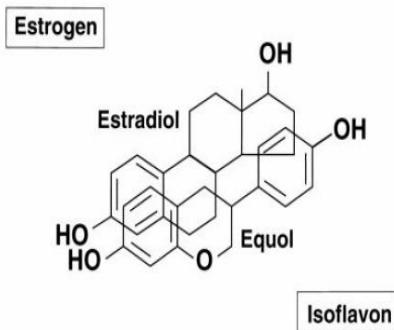


Abbildung 1.11: Strukturelle Ähnlichkeit von Östrogenen und Phytoöstrogenen (hier: das Isoflavon Equol) [82].

Neben der krebspräventiven Wirkung wird für Isoflavone auch ein kardioprotektiver Effekt diskutiert. In klinischen Studien zeigte sich eine Senkung des Cholesterinspiegels bei regelmäßiger Aufnahme von Sojaprodukten.

Isoflavone werden aufgrund der östrogenen Aktivität als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie diskutiert.

Eine weitere Möglichkeit der Anwendung besteht in der Osteoporoseprophylaxe durch Phytoöstrogene.

Weiterhin beeinflussen Phytoöstrogene das Immunsystem und stellen auch hier eine Therapiemöglichkeit dar. In vitro-Ergebnisse zeigen, dass in niedrigen Konzentrationen das Immunsystem eher stimuliert wird, während es in hoher Konzentration eher gehemmt wird. Die Wirkung kommt unter anderem dadurch zustande, dass Immunzellen Östrogenrezeptoren exprimieren können.

Zu den hormonabhängigen Mechanismen der Phytoöstrogene gehören auch die Induktion der sex hormone binding globulin (SHBG)-Synthese in der Leber und die Hemmung der Aromatase. Das SHBG ist ein Transportprotein für Sexualhormone.

Es gibt aber noch eine ganze Reihe hormonunabhängiger Wirkungen der Phytoöstrogene, dazu gehören unter anderem die Hemmung der Zellproliferation der Tumorzellen, die Induktion von Apoptose, die Hemmung der DNA-Topoisomerase II, die Hemmung verschiedener Proteintyrosinkinasen, allgemein antioxidative Aktivität, die Hemmung der Angiogenese und die Aktivierung des peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR)- γ [60] [24]. PPAR- γ sind Transkriptionsfaktoren, die einen starken Einfluss auf molekulare Vorgänge in normalen und Krebszellen haben. [86] [67].

In asiatischen Ländern werden etwa 15-40 mg/ Tag Isoflavone aufgenommen, während in den westlichen Industrieländern nur durchschnittlich 2 mg/Tag aufgenommen werden [60] [24].

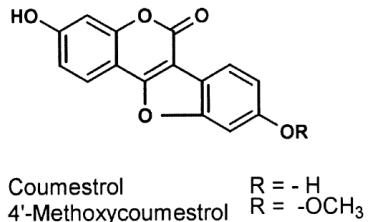
Coumestane:

Abbildung 1.12: Strukturformeln der wichtigsten Coumestane [60].

1.7 Der Lein- *Linum usitatissimum*

Die Leinpflanze kommt in zwei Unterarten und vielen Varietäten vor. Sie wird auch *Linum usitatissimum* genannt, was soviel bedeutet wie äußerst nützlicher Lein. Sie gehört zur Familie der Linaceae und wird als alte Kulturpflanze weltweit angebaut. Beheimatet ist der Lein im Mittelmeerraum, Vorderasien und Nordafrika. Abbildung 1.13 zeigt die Blüte einer Leinpflanze.

Die Leinpflanze wird bis zu 1,5 m hoch und wirkt eher zart. Die himmelblauen, aber manchmal auch weißen, hellrosa oder lila Blüten sind an langen Stielen rispenartig angeordnet. Die Früchte sind hellbraune Kapseln. Sie können bis zu 10 Samen enthalten [48] [45].

Im Altertum wurden aus dem Lein Fasern hergestellt, die unter anderem für Schiffssegel verwendet wurden. Die Gebiete des heutigen Deutschlands waren zwischen dem 12. und 13. Jahrhundert führend im Flachsanbau. [50].

Die Bestandteile des Leins wurden schon früh gegen die verschiedenen Erkrankungen verwendet, unter anderem bei oberen respiratorischen Infekten, chronischer Obstipation, Magenschmerzen und Harnwegsinfekten. Auch bei Arthritis, Krebserkrankungen, Herzerkrankungen, Gewichtsverlust und Prostatavergrößerungen fand die Leinpflanze bereits Anwendung.

Etwa in den 1980er Jahren begann auch ein stetig wachsendes Interesse an den medizinischen Möglichkeiten des Leins. Zunächst zeigte sich das Interesse an der biologischen Aktivität der Omega-3-Fettsäuren und der α -Linolsäure. Dann wurden weitere Inhaltsstoffe gefunden, wie unter anderem die Lignane. Gerade die Rolle der Lignane in der Prävention von Krebserkrankungen trat zunehmend in den Mittelpunkt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Leinpflanze und hier vor allem auch die Lignane eine Wirkung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen zeigen, aber auch Wirkungen bei Nierenerkrankungen, wie zum Beispiel bei der Lupusnephritis sind beschrieben worden. In einer Arbeit von Zanwar et al. 2011 zeigt sich eine kardioprotektive Aktivität von Leinextrakt bei induzierten Myokardnekrosen bei Ratten [90].

Bisher wurden vor allem der Leinsamen und das Leinöl in der Medizin genutzt. Das



Abbildung 1.13: Blüte der Leinpflanze [82].

Leinöl enthält nur die α -Linolsäure, nicht die Lignane. Die Leinpflanze ist eine reiche Quelle an Lignanen, welche Östrogenrezeptor-agonistische und -antagonistische Einflüsse mit Effekten bei hormonsensiblen Krebsarten wie Mammakarzinom, Endometriumkarzinom und Prostatakarzinom zeigt. Ergebnisse von Lehraiki et al. 2010 zeigen, dass Lignane die Entwicklung von Brustkrebs-Zellen modulieren [62]. In einer Arbeit von Bergmann et al. 2007 zeigte sich, dass Lignane Östradiol-induziertes Wachstum, die Angiogenese und die Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors in menschlichen Brustkrebszellen in vivo hemmen können [30]. Lein enthält unter anderem die Lignane Secoisolariciresinol diglucosid (SDG), Enterolacton und Enterodiol. Diese können die Zellproliferation vermindern, die Aktivität der Aromatase, der $5\text{-}\alpha$ -Reduktase und der $17\text{-}\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase inhibieren. Es hat sich auch gezeigt, dass Lignane die Synthese der SHBG erhöhen können.

Insgesamt zeigte sich die Tendenz, dass der Lein mehr Einfluss auf den Östrogenmetabolismus hat als Soja. Außerdem zeigt die Leinpflanze antioxidative Effekte. Omega-3-Fettsäuren können freie Sauerstoffradikale von Neutrophilen und Monozyten reduzieren. Auch die Produktion von Interleukin 1, Tumor-Nekrose-Faktor und Leukotrien B4 wird gesenkt. Lignane können als Plättchenaktivierender Faktor-Antagonist wirken und somit die Produktion von freien Sauerstoffradikalen in neutrophilen Zellen reduzieren. Antiinflammatorische Prozesse haben sich ebenfalls unter der Gabe von Leinsamen und Leinöl gezeigt. α -Linolsäure supprimiert unter anderem auch die T-Zellfunktion.

Leinsamen sind reich an Fetten, vor allem an ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure, α -Linolensäure und Ölsäure. α -Linolsäure und Linolsäure sind essentielle Fettsäuren, das heißt sie können vom Menschen nicht selbst hergestellt werden und müssen essenziell mit der Nahrung zugeführt werden. Außerdem kommen im Leinsamen noch Ballaststoffe, Schleimstoffe, Proteine und Vitamine, wie Vitamin B1, B2, B6, E, sowie Nicotin-, Fol- und Pantothensäure vor. Den Leinsamen wird daher vor allem eine peristaltikfördernde und schleimhautschützende Wirkung des Darms zugeschrieben. Außerdem sind sie als diätetisches Nahrungsergänzungsmittel verwendbar. Die Ergänzung einer Diät mit ungesättigten Fettsäuren

und einer verminderten Zufuhr gesättigter Fettsäuren kann cholesterinsenkend wirken. Bei äußerlichen Entzündungen hilft der Lein auch in Form eines Breiumschlages [29].

Tumorprotektive Effekte gewinnen insgesamt zunehmend an Bedeutung. Im Gegensatz zur Sojapflanze kann der Lein in Deutschland kultiviert werden. Erste Versuche mit Rohextrakten der Leinpflanze sind im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock an Chorionkarzinomzellen gemacht worden und führten zu einer Reduzierung des Zellwachstums [23]. In dieser Arbeit steht die Leinwurzel im Mittelpunkt. In mehreren Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock (unter anderem von M. Szewczyk, N. Strater, K. Theil) konnte gezeigt werden, dass die Leinwurzel eine besonders gut hemmende Wirkung auf Mammakarzinomzellen hat [5] [26] [29].

1.8 Zielstellung der Arbeit

Das Interesse an einer gesunden Lebensweise und die Beeinflussung von Krankheiten durch eine gesunde Ernährung ist nach wie vor von großem Interesse.

In Deutschland lässt sich im Gegensatz zu Soja die Leinpflanze kultivieren. Erste Versuche mit den Rohextrakten der Leinpflanze sind an Chorionzellen im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik in Rostock durchgeführt worden. Hier zeigte sich in der Arbeit von Abarza 2011 bereits unter dem Einfluss der Leinpflanze eine dosisabhängige Reduzierung des Wachstums der Chorionzellen [23]. Es folgten weitere Versuche mit der Leinpflanze an Mammakarzinomzellen. Hier untersuchte M. Szewczyk 2007 den Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte auf die Zellproliferation der Mammakarzinomzellen. Dabei wurden Blatt- Stengel- und Wurzelextrakte untersucht. Es stellte sich heraus, dass mit dem Wurzelextrakt die besten Resultate erzielt werden konnten. Das Wurzelextrakt hat einen großen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation und die Stoffwechselaktivität der Zellen [81]. Auch in der Arbeit von Abarzura wurden die besten Ergebnisse mit dem Wurzelextrakt erzielt [23]. Das Wurzelextrakt kam somit für weitere Untersuchungen in Frage.

Es folgten weitere Arbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik in Rostock. Durch K. Theil 2011 wurden Untersuchungen zum Einfluss des Leinwurzelextraktes auf Mammakarzinomzellen im Vergleich mit bereits bekannten Phytoöstrogenen wie zum Beispiel Genistein und Daidzein durchgeführt [82]. N. Strater 2011 untersuchte den Einfluss von Leinwurzelextrakten unterschiedlicher Altersstufen auf die Vitalität von Mammakarzinomzellen. Hier zeigten sich vor allem bei der alten Wurzel hinsichtlich Zytotoxizität und Proliferationshemmung Vorteile [78]. Zur Zeit erfolgen weitere Untersuchungen zur Wirkung der Leinwurzel, unter anderem wird aktuell untersucht, in welchen Dosierungen das Wurzelextrakt seine beste Wirkung zeigt. Es gibt ebenfalls Untersuchungen zu den Wachstumsbedingungen der Leinpflanze.

Bei allen bisher vorgelegten Arbeiten sind immer Kontrollen durchgeführt worden, zum einen die Östrogenkontrollen und zum anderen die Tamoxifenkontrollen. Tamoxifen ist ein in der Medizin bereits seit langem verwendetes Medikament zur endokrinen Therapie bei hormonsensiblen Mammakarzinopatientinnen. Es gehört zu den SERM. Tamoxifen wirkt antiöstrogen, indem es an die Östrogenrezeptoren bindet. Dadurch kommt es zur Inhibierung der Bindung der Östrogene. Tamoxifen bindet aber auch an gesunde Zellen und beschränkt dadurch die Wachstumsaktivität. Somit wird abnormales Wachstum und somit die Krebsentwicklung gestoppt [81].

Im medizinischen Alltag werden viele Medikamente gleichzeitig verabreicht. Dies führt

zu Interaktionen. Die Stoffe schwächen sich entweder gegenseitig ab oder verstärken sich sogar in ihrer Wirkung. Dies wäre nun bei der Gabe von Leinwurzelextrakt eine wichtige zu klärende Frage: kann man Leinwurzelextrakte und Tamoxifen gleichzeitig geben? Kommt es durch die gleichzeitige Gabe sogar zu einer Verstärkung der Wirkung beider Substanzen oder zeigt sich eher eine Abschwächung? Möglich ist auch, dass sich keine Veränderung in der Wirkung ergibt. Insgesamt kommen immer mehr Medikamente auf den Markt, darunter auch viele Substanzen, die aus Naturprodukten hergestellt werden, wie es zum Beispiel beim Leinwurzelextrakt der Fall wäre. Deshalb ist es wichtig, zu untersuchen, wie die Leinwurzel und das Tamoxifen zusammen wirken.

Das Interesse in unserer Gesellschaft an einer gesunden Lebensweise nimmt zu. Aber auch Naturstoffe können Gefahren bei der Verabreichung in sich bergen. Die Leinpflanze verfügt über einen hohen Anteil an Phytoöstrogenen, insbesondere in Form der Lignane. Gerade deshalb ist es interessant, eine hier zu kultivierende Pflanze genauer zu untersuchen. Um die Einflüsse des Wurzelextrakts und der Kontrollsubstanzen auf die Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden drei verschiedene *in vitro*-Testverfahren verwendet. Dabei wurde die Zytotoxizität der Testsubstanzen sowie deren Wirkung auf die Stoffwechselaktivität und Proliferation der Karzinomzellen untersucht. Diese verschiedenen Testmethoden mit jeweils unterschiedlichen chemischen Mechanismen und Ansatzpunkten wurden verwendet, um zusätzlich Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen der Testsubstanzen zu ziehen. Zum Einsatz kommt in dieser Arbeit die östrogenrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie MCF 7. Die Pflanzenpräparate wirken, wie in den zahlreichen Voraarbeiten bestätigt, dosisabhängig auf die Mammakarzinomzellen. Deshalb werden in dieser Arbeit auch verschiedene Konzentrationen der Substanzen untersucht. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung zeigt die Östrogenrezeptoren auf den Zelloberflächen an. Die Phytoöstrogene wirken vor allem über die ER α und ER β , weshalb der Nachweis dieser Rezeptoren wichtig für die weitere Diskussion ist. Zusätzlich wurde noch eine Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie durchgeführt zur genaueren Analyse des Leinwurzelextraktes. Dadurch lassen sich einzelne Substanzklassen in der Wurzel nachweisen. Dabei sollte festgestellt werden, in welchem Maße die Phytoöstrogene in der Leinwurzel enthalten sind und ob es eventuell noch andere Stoffgruppen gibt, die an der Wirkung der Leinwurzel beteiligt sein könnten.

Fragestellungen dieser Arbeit:

- 1. Wie wirken Tamoxifen und Leinwurzelextrakt bei gleichzeitiger Gabe auf Mammakarzinomzellen?
- 2. Zeigt sich eine dosisabhängige Wirkung der Leinwurzelextrakte?
- 3. Zeigt sich eine dosisabhängige Wirkung der Leinwurzelextrakte zusammen mit Tamoxifen?
- 4. Ist eine gleichzeitige Gabe der beiden Substanzen im klinischen Alltag sinnvoll?

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

2.1.1 Lignanextraktion nach Luyengi et al. (1996)

- Lein (*Linum usitatissimum*), Sorte Barbara; LUFA, Rostock
- Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Faltentrichter, Durchmesser 185 mm, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
- Ethanol, Carl Roth GmbH & Co
- Vakuumrotationsverdampfer VV 2011, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
- Ultraschallbad: Sonorex; SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf

2.1.2 Testverfahren

Detection-Kits

- Laktatdehydrogenase (LDH)-Test: Cytotoxicity Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test: Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Bromdesoxyuridin (BrdU)-Test: Cell Proliferation Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), BrdU (colometric), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Chemikalien

- 1 N HCl (= 100 ml H₂O + 8,33 ml HCl konz.); ROTH, Karlsruhe
- 1 M H₂SO₄; ROTH, Karlsruhe
- Triton X-100 (Octoxinol-9); Ferak Berlin GmbH, Berlin

- 17 β -Östradiol, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Tamoxifen, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

Materialien

- ELISA-Reader (Model 680 Microplate Reader); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
- Microplate Manager Software (Vers. 5.2.1); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
- Zellkultur Testplatte (96 Wells); TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Zellkultur

Chemikalien

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS) , pH= 7,4 (8,0g Natriumchlorid (NaCl) + 2,9g Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) x 2 Wasser (H₂O) + 0,2 Gramm (g) NaH₂PO₄ + 0,2 g Kaliumchlorid (KCl) / 1,0 l Aqua destilliert (dest.))
- Fetales Kälberserum (FKS), Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Amphotericin B: Fungizone, 250 UGML, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Solution: 10000Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin/ Milliliter (ml); 0,9% NaCl, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Trypanblau (0,4%ig), Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)- Buffer Saline Solution (HEPES-BSS) w/o Calcium/ Magnesium), Promocell
- Trypsin-Neutralisations-Solution (TNS), Promocell

Materialien

- Zentrifuge: Hettrich
- Kulturflaschen: Nuclon TM Surface
- Sterilbox; Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Reaktionsgefäße 50 ml; Grüner bio-one Cellstar R
- Kühltruhe (-80 °C); Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Desinfektionsmittel; Bacillol R plus, Bode
- Brutschrank (37°C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂)), Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- 96-Well-Platte,Grüner bio- one Cellstar R

- Pipetten, Eppendorf, Hamburg
- Bürker-Kammer (Tiefe: 0,1 mm; 0,0025 m²); Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg

2.1.4 Immunhistochemie

- Elite-Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Kit von Vectastain, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Farbstoff: Lin Red IHC

Chemikalien

- Farbstoff: Lin Red IHC (HRP- Substrate), Linaris-Biologische Produkte GmbH
- Horse-Serum: R.T.U. Normal Horse Serum (2,5%), Vector
- Zweiter Antikörper: Universal, Imm PRESS TM Reagent Peroxidase, Anti-Mouse/Rabbit-Ig, Vector
- PBS , 10 mM, pH= 7,4 (8,0 g NaCl + 2,9g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2g KCl/ 1,0 l Aqua dest.)

Antikörper

- Östrogenrezepor α : Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone: 1D5, DAKO North America, Inc., Carpinteria, CA 93013 USA
- Östrogenrezeptor β : Mouse Anti Östrogen REC. BETA 1 (Serotec)
- Progesteronrezeptor: Monoclonal Mouse Antihuman, Clone Pg R 636, DAKO North America, Inc., Carpinteria, CA 93013 USA

2.1.5 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie

- Massenspektrometer,Finnigan, MAT, Bremen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial stammt von der Pflanze *Linum usitatissimum*, genannt der Gemeine Lein, Sorte Barbara. Im April 2008 wurde der Lein ausgesät und im Juli 2008 geerntet. Es handelt sich hierbei um eine Freiland-Sorte. Der Lein wurde nach der Ernte bei -80°C in der Kühltruhe gelagert. Die Herstellung des Leinwurzelextraktes erfolgt in Kooperation mit dem Fachbereich Biowissenschaften der Universität Rostock [4] .

2.2.2 Extraktion nach Luyengi et al., 1996

Bei dieser Methode wird zunächst eine bestimmte Menge Lein (15 g) tiefgefroren und unter flüssigem Stickstoff mit einem vorgekühlten Mörser feinpulvrig zerkleinert. Die gemörserte Probe wird mit Hilfe eines Einführtrichters in einen Rundkolben überführt und mit 132 ml Ethanol versetzt. Unter einem Abzug wird die Probe in einem Wasserbad unter Rückfluss 15 min bei 70°C gekocht, um sie dann abkühlen zu lassen und über einen Falterfilter zu filtrieren, bis die Lösung klar ist. Das Filtrat wird dann in einen 100 ml Rundkolben am Rotationsdampfer bei 42°C eingedampft (siehe Abbildung 2.1). Die eingedampfte Probe wird in 8 ml Aqua dest. aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Diese homogene Flüssigkeit überführt man anschließend in ein Falkon- Röhrchen. Fünfmal wird diese Flüssigkeit mit 6 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Dabei entsteht eine deutliche Phasentrennung, wobei die untere Phase aufgrund der Dichte die wässrige und die obere, in der sich die Probe befindet, die Ethylacetat-Phase ist. Die obere Schicht wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in einen 50 ml-Rundkolben überführt. Vorher bestimmt man das Leergewicht des Kolbens. Dann wird die Probe bis zur vollständigen Trocknung am Rotationsdampfer bei 42°C eingedampft. Anschließend erfolgt die Nachtrocknung der eingedampften Probe im Exsikkator, in dem sich getrocknetes Silikagel befindet. Silikagel wird auch Kieselgel genannt und besteht zu 98 % aus Siliziumdioxid (SiO_2). Es besitzt eine große innere Oberfläche und ist stark wasseranziehend [13]. Die Probe muss anschließend dunkel gelagert werden. Zum Schluss wiegt man den Kolben und bestimmt das Nettogewicht des Extraktes. In meiner Extraktion ergab sich ein Nettogewicht von 134,9 mg. Anschließend wird die Probe in 100 % Ethanol gelöst. Die Menge an Leinwurzelextrakt von 134,9 mg wurde also in 1349 μl Ethanol gelöst.



Abbildung 2.1: Rotationsverdampfer [1].

2.2.3 Extrakte und Kontrollen

Aus dem hergestellten Extrakt der Leinwurzel wurde eine Stammlösung von 100 mg/ml ange setzt. Daraus wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

für den LDH-Test (aufgrund einer 1:200-Verdünnung in den Tests):

- 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

für den MTT- und den BrdU-Test (aufgrund einer 1:100-Verdünnung in den Tests):

- 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Dabei war für die ersten Versuchsansätze im LDH-Test zunächst eine Konzentrationsreihe von 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (beziehungsweise von 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im MTT- und BrdU-Test) grundlegend und im weiteren Verlauf wurden zusätzliche Konzentrationen hinzugefügt. Diese sind in der Auswertung jeweils den Diagrammen zu entnehmen.

Für den Ansatz von Tamoxifen war folgende Verdünnung grundlegend:

- $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Diese Konzentration verringerte sich im Experimentieransatz durch weitere Verdünnung auf folgende Werte:

im LDH-Test:

- $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l

im MTT- und BrdU-Test:

- $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Es fanden vor den eigentlichen Versuchen einige Versuche zur Dosisfindung des Tamoxifens statt.

Für den Ansatz von Östradiol wurde folgende Verdünnungsreihe aufgestellt:

- $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l

- $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l

Diese Konzentrationen verringerten sich auch hierbei im Experimentieransatz auf folgende Werte:

im LDH-Test:

- $5 \cdot 10^{-10}$ mol/l

- $5 \cdot 10^{-12}$ mol/l

im MTT- und BrdU-Test:

- $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l

- $1 \cdot 10^{-11}$ mol/l

Tamoxifen gilt hier als Negativkontrolle und die mitgeführte Östradiol-Kontrolle ist in allen Tests als Positiv-Kontrolle anzusehen. In jedem Testansatz erfolgte immer der Bezug der Extrakte beziehungsweise der Tamoxifen- und Östradiol-Kontrollen auf eine ethanolhaltige Probe. Diese besteht aus gleicher Zellzahl, Medium und Testkit und einer den Extrakten und Kontrollen an Volumen gleichwertigen Menge an Ethanol. In den folgenden Auswertungen ist als Negativkontrolle diese ethanolische Leerkontrolle gemeint. Es erfolgte in allen Testansätzen eine vierfache Bestimmung.

2.2.4 Zellkulturlinien

In dieser Arbeit wurden die Pflanzenextrakte der Leinpflanze an der humanen Zellkulturlinie MCF7 untersucht (siehe Abb. 2.2). Die MCF7- Zellen gehören zu den Mammakarzinomzelllinien und exprimieren die Östrogenrezeptoren α und β [19].

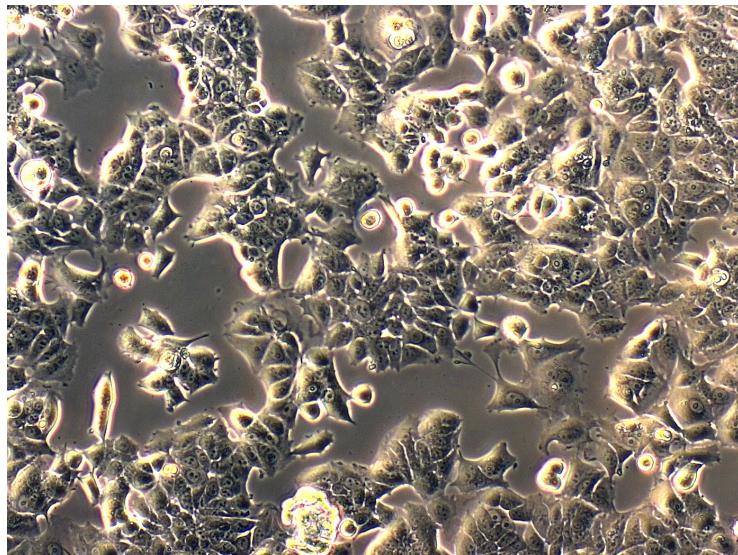


Abbildung 2.2: Die MCF-7-Zellen unter dem Lichtmikroskop.

2.2.5 Zellkulturmedien

Die Zellkulturen wurden in DMEM kultiviert. Zur Herstellung wurden 26,89 g DMEM, 5,2 g HEPES und 6,0 g Natriumhydrogencarbonat in zwei Liter (l) destilliertem Wasser gelöst. Der ph-Wert ist auf 7,4 eingestellt und das Medium steril filtriert worden. Für die Zellkultivierung wurden dem Medium noch FKS (10%), Penicillin/Streptomycin (1%) und Amphotericin (0,5%) hinzugefügt. Das FKS dient als Protein- und Wachstumskomponente. Penicillin und Streptomycin sind Antibiotika und sollen das Wachstum von Bakterien im Medium verhindern. Amphotericin ist ein Fungizid und hemmt das Pilzwachstum.

2.2.6 Zellkultivierung

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit etwa 15 ml DMEM versetzt. Dann wurde diese Zellsuspension bei 1000 Umdrehungen 5 Minuten (min) ohne Bremse zentrifugiert. Es folgte das Abgießen des Überstandes und die Zellen wurden in 5 ml DMEM aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Diese Flasche wurde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen sind dann dreimal pro Woche mit frischem Medium versetzt worden. Dazu wurde die Hälfte des verbrauchten Mediums oder das ganze Medium vollständig abgesaugt und anschließend frisches hinzugegeben. Wenn der Boden der Zellflaschen zugewachsen war, erfolgte eine Passage der Zellen in größere Flaschen. Zunächst wurde das Medium komplett abgesaugt. Dann erfolgte die Spülung der Zellen in der kleinen Flasche mit 5 ml PBS, um das FKS auszuwaschen. Dadurch wurde verhindert, dass sich das Trypsin am FKS und nicht an den Zellen anlagert. Dann erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin-Ethyldiamintetraacetat (EDTA), um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Die Ablösung erfolgte in etwa 10 min im Brutschrank bei 37°C. Nach Ablösen der Zellen wurden 7,5 ml DMEM zur Neutralisation hinzugegeben, um eine Zerstörung der Zellen durch Trypsin zu verhindern und das Ganze in

ein 50 ml-Röhrchen umgefüllt. Es erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen und der Überstand wurde wieder abdekantiert. Nach der Zugabe von Medium wurde das Röhrchen erneut gut geschüttelt. Das Ganze wurde dann entsprechend der Zellzahl in eine größere Flasche mit Medium überführt.

2.2.7 Ermittlung der Lebendzellzahl

Da für die Untersuchungen eine bestimmte Lebendzellzahl eingesetzt werden sollte, war die Zählung der Zellen vorher notwendig. Bei den Versuchen sollten sich in jedem Well 5×10^5 Zellen/ml befinden. Es wurden dafür 360 μl Medium mit 20 μl der Zellsuspension und 20 μl Trypanblau vermischt. Dadurch ergab sich dann eine Verdünnung von 1:20. Trypanblau dient dazu, die toten Zellen anzuzeigen. Er gehört zu den Azofarbstoffen und dringt in die toten Zellen ein, indem das Farbstoff-Anion an cytosolische Proteine bindet. Die lebenden Zellen bleiben farblos und somit ist eine Unterscheidung möglich. Etwa 20 μl der Lösung werden dann auf jede Seite einer Bürker-Zählkammer aufgetragen (siehe Abbildung 2.3). Dann werden aus jeweils 25 kleinen Quadranten beider Seiten der Kammer die Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt. Die blau gefärbten toten Zellen werden ausgelassen. Die ermittelte Summe wird dann zur Berechnung der Gesamzellzahl herangezogen, die man mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen}/\text{ml} = \text{Zellzahl} \times 10(\text{Verdünnung}) \times 10^4 \quad (2.1)$$

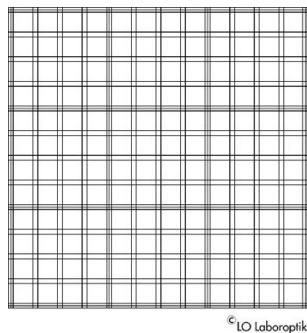


Abbildung 2.3: Ausschnitt des Zählnetzes unter dem Mikroskop einer Bürker-Zählkammer [3].

2.2.8 Immunhistochemische Untersuchungen

Durch immunhistochemische Untersuchungen soll ermittelt werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten MCF7-Zellen α - beziehungsweise β -Östrogenrezeptoren exprimieren. Hierzu wurde das Elite-ABC-Kit von Vectastain verwendet. Das Wirkprinzip besteht in einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Antikörper ist gegen den Östrogenrezeptor gerichtet und markiert. In einer Folgereaktion können über diese Markierung die Antikörper-gebundenen Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden.

Hierbei bindet der Primär-Antikörper an den Rezeptor. Ein weiterer sekundärer Antikörper, der biotinyliert ist, wird hinzugegeben und bindet an den Primär-Antikörper. Nach Zugabe eines Enzyms und Avidin resultiert ein Avidin-Bioin-Peroxidase-Komplex, wodurch nach Zugabe eines Farbstoffes zelluläre Antigene nachgewiesen werden können [68].

Durchführung

Es erfolgt zunächst die Zellaussaat auf eine 24-Well-Platte. Es werden $300 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in jedes Well gegeben. Es wird dazu wieder die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Ermittlung der Lebendzellzahl). Die Zellen müssen zunächst für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 adhärent werden. Am dritten Tag wird das DMEM abdekantiert und es erfolgt die Spülung der adhärent gewordenen Zellen mit PBS. Nach Herstellervorschrift werden die Lösungen vorbereitet. Zunächst erfolgt die Zugabe von Horse-Serum auf alle Zellen, um unspezifische Hintergrundreaktionen durch natürlich vorhandenes Biotin zu blockieren. Die Inkubationszeit dieses Arbeitsschrittes beträgt 30 min und dann wird der Überstand entfernt. Es erfolgt die Zugabe des primären Antikörpers. Ein zusätzliches Well wird mit verdünntem Horse-Serum benetzt und als Leerprobe mitgeführt. Über Nacht erfolgt die Inkubation im Kühlschrank. Am nächsten Tag werden die Zellen mittels PBS erneut gespült und anschließend erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers. Nach einer halben Stunde erfolgt die Spülung mit PBS und es wird das ABC-Reagenz aufgetragen, welches 30 min inkubieren muss. Anschließend erfolgt die Spülung mit PBS und die Zugabe des Farbstoffes. Unter dem Mikroskop ist die Farbentwicklung sichtbar. Dann erfolgt die Spülung mit Leitungswasser, um zum Schluss die Färbung unter dem Mikroskop und somit den Rezeptorstatus zu beurteilen.

2.2.9 Testvorbereitung und Testbedingungen

Es wurde soweit möglich immer dieselbe Menge an Zellen pro Experiment eingesetzt. Die optimale Zellzahl für die verwendeten Testverfahren und Zelllinien wurde bereits in früheren Versuchen bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt eine optimale Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml.

Bei jedem Versuch wurden Kontrollen mitgeführt: eine Hintergrundkontrolle (Blindwert, diese erhält das jeweilige Nährmedium ohne Zellen) und zwei Negativkontrollen, zum einen Zellen in ihrem jeweiligen Medium (Negativkontrolle 1) und zum anderen Zellen in ihrem jeweiligen Medium mit Ethanol (Negativkontrolle 2).

2.2.10 Versuche zur Zytotoxizität und Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zytotoxizität und der Zellproliferation sind in dieser Arbeit die LDH-Zytotoxizitäts- beziehungsweise MTT- und BrdU- Tests verwendet worden. Bei den Versuchen

wurden jeweils 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Lebendzellzahl wurde vorher mittels Bürker-Zählkammer bestimmt. Dann wurden die Zellen in DMEM aufgenommen und in eine 96er-Well-Platte ausgesät. Dabei kamen in jedes Well $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension. Über Nacht wurden die Zellen in den Brutschrank ($37^\circ\text{C}, 5\% \text{CO}_2$) gestellt, um sie an der Platte adhärent werden zu lassen. Die Tests wurden jeweils drei- bis viermal wiederholt und pro Versuch sind vier Ansätze gemacht worden.

2.2.11 LDH- Zytotoxizitätstest

Prinzip

Die LDH-Aktivität basiert auf einem enzymatischen Test: Zuerst wird Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ durch die gleichzeitige LDH-katalysierte Reaktion von Lactat zu Pyruvat reduziert. Dann wird der Katalysator Diaphorase und das Tetrazoliumsalz 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) hinzugegeben. Die Diaphorase katalysiert die Reduktion des INT zu Formazan. Gleichzeitig wird $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Abbildung 2.4 zeigt das Prinzip des LDH-Tests.

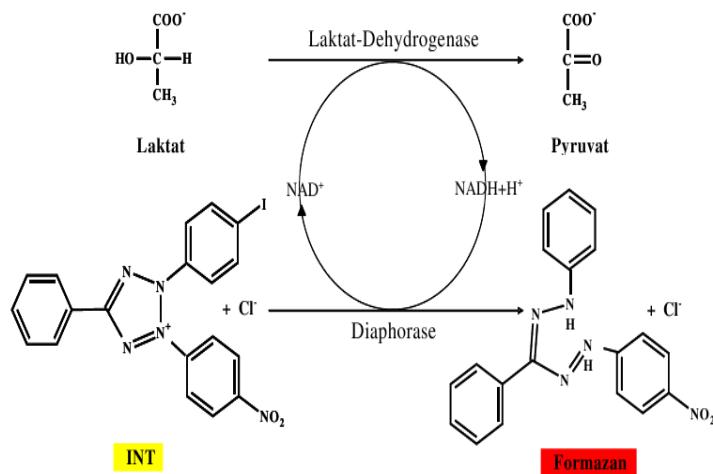


Abbildung 2.4: Prinzip des LDH-Tests [82].

Eine Zunahme der Menge an toten Zellen korreliert mit einer Zunahme der LDH-Enzymaktivität im Zellüberstand. Die Zunahme der Aktivität der Enzyme korreliert wiederum mit der Menge an Formazan während einer limitierten Zeiteinheit. Deshalb ist die Menge der entstandenen roten Farbe aus dem vorher gelben INT im Test proportional zur Menge der lysierten Zellen. Das entstandene Formazan kann nun am ELISA-Reader photometrisch quantifiziert werden [17].

Durchführung

Nach 24 Stunden Zellinkubation wird das alte Zellkulturmedium (mit 10 % FKS) durch $198 \mu\text{l}$ frisches DMEM (mit 1 % FKS, aufgrund der LDH-Aktivität des FKS) ersetzt. Dann wer-

den die Extrakte und die Positiv- und Negativkontrollen hinzugegeben. Zusätzlich gibt es bei diesem Test eine zusätzliche Kontrolle, die High control, die die maximale LDH-Aktivität in den Zellen anzeigt. Sie besteht aus 198 μl Medium mit Zellen und 1% Triton. Die Substanzen müssen erneut 24 Stunden inkubieren. Am dritten Tag kann die LDH-Aktivität gemessen werden, woraus dann mit dieser Formel der prozentuale Anteil toter Zellen berechnet werden kann:

$$\text{Zytotoxizitaet}[\%] = 100 \frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Negativkontrolle}2}{\text{Extinktion Highcontrol} - \text{Extinktion Negativkontrolle}2} \quad (2.2)$$

Schritte

1. Zellkultivierung: 100 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Zellsuspension in 96-Well-Platte, 24 Stunden (h) Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2)
2. Mediumwechsel: 198 $\mu\text{l}/\text{Well}$ DMEM (1 % FKS), Zugabe der Leinwurzelextrakte und der Kontrollen, 24 h Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2)
3. 100 μl Überstand in neue 96-Well-Platte
4. 100 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Reaction mixture auf Überstand, 10 min bis 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
5. Abstoppen der Reaktion mit HCL
6. Messung am ELISA-Reader bei 492 Nanometer (nm); Referenz 620 nm

2.2.12 MTT-Zellproliferationstest

Prinzip

Das Prinzip basiert auf der Umwandlung von dem gelben Tetrazoliumsalz MTT in violette Formazankristalle durch die mitochondrialen Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Sysems [18]. Diese Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, weshalb also die Umwandlung zum Formazan die Vitalität der Zellen angibt. Die Intensität der Farbänderung ist proportional zur Zellzahl und Stoffwechselaktivität [81]. Die Absorption des Formazans wird mittels ELISA-Reader bestimmt. Abbildung 2.5 zeigt das Prinzip des MTT-Tests.

Durchführung

Das Medium wird 24 h nach Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2) gewechselt und die Extrakte sowie die Positiv- und Negativkontrollen auf die Zellen in einer 96er-Well-Platte hinzugegeben.

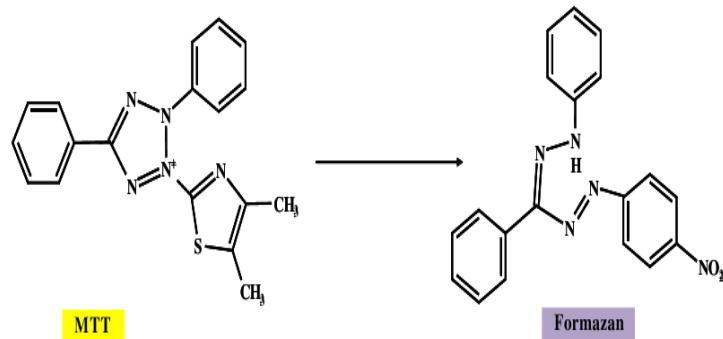


Abbildung 2.5: Prinzip des MTT-Tests [82].

Schritte

1. Zellkultivierung: 100 μl /Well Zellsuspension in 96-Well-Plate, 24 h Inkubation im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2)
2. Mediumwechsel, Zugabe der Leinwurzelextrakte und der Kontrollen, 24 h Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2)
3. 10 μl /Well MTT-Reagenz, 4 h Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2)
4. 100 μl /Well Solubilisierungslösung, Inkubation im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2)
5. Messung am ELISA-Reader bei 570 nm

2.2.13 BrdU-Zellproliferationstest

Prinzip

Das Prinzip basiert auf dem Einbau von BrdU in die DNA anstelle von Thymidin. Die DNA-Polymerase der Zellen baut das BrdU während der Replikation in die DNA ein. Dann werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Es erfolgt die Zugabe eines BrdU-Antikörpers, welcher an das BrdU der neu synthetisierten DNA bindet. Dieser Immunkomplex wird mittels einer Substratreaktion (mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)) mit Farbumschlag gemessen. Die Farbintensität korreliert mit der Menge der neu synthetisierten DNA und demzufolge mit der Anzahl proliferierender Zellen. Die Absorption des Reaktionsproduktes wird mit dem ELISA-Reader gemessen [20]. Abbildung 2.6 zeigt das Prinzip des BrdU-Tests.

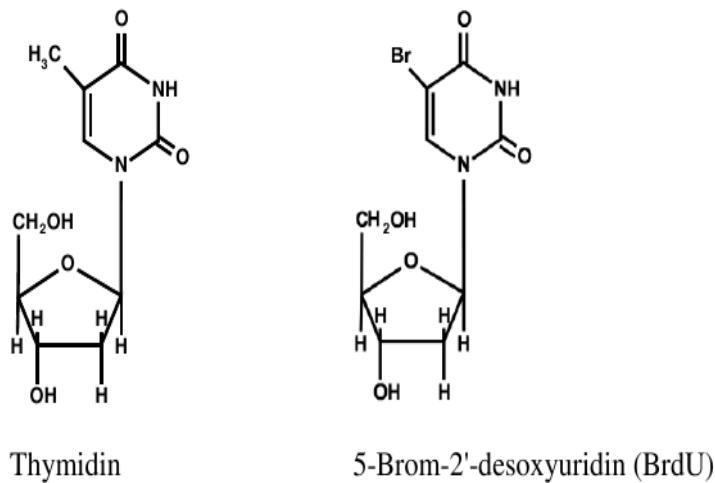


Abbildung 2.6: Prinzip des BrdU-Tests [82]

Durchführung

Nachdem die Zellen 24 h im Brutschrank waren, wurden die Extrakte beziehungsweise die Positiv- und Negativkontrollen und anschließend das BrdU hinzugegeben. Zusätzlich war ein Blindwert nötig, das heißt ein Wert, der die unspezifische Bindung von BrdU und Anti-BrdU-POD an die Mikrotiterplatte angibt und eine Backgroundkontrolle, das heißt es wurde zusätzlich überprüft, ob eine unspezifische Bindung von Anti-BrdU-POD an die Zellen ohne Anwesenheit von BrdU stattfindet.

Schritte

1. Zellkultivierung: 100 µl/Well Zellsuspension in 96-Well-Platte, 24 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂), Zugabe der Leinwurzelextrakte und der Kontrollen, 24 h Inkubation im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂)
2. Markierung mit 10 µl/Well BrdU, 3 h Inkubation im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂), Entfernung des Mediums
3. 200 µl/Well FixDenat, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, Entfernung des FixDenat
4. 100 µl/Well Anti-BrdU-Peroxidase (POD)-working solution, 60 min Inkubation bei Raumtemperatur, Entfernung der Anti-BrdU-POD-working-solution
5. 3 x Waschen mit Waschpuffer
6. 100 µl/ Well Substratlösung, 10 min bis 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, entsprechend der Farbentwicklung
7. Abstoppen der Reaktion mit 25 µl/Well H₂SO₄
8. Messung am ELISA-Reader bei 450 nm; Referenz 620 nm

2.2.14 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie wurde 1910 durch J. J. Thomson entwickelt und findet seine Anwendung in der Analyse von Testsubstanzen [35]. Es sind sowohl Aussagen zum Vorhandensein einer bestimmten Sorte von Teilchen (qualitativ) als auch zur Menge der Teilchen (quantitativ) möglich. Vor allem im Bereich der Bodenanalytik sind bis zu 85% der auftretenden Massensignale im Boden identifiziert worden. Man kann diese Signale mittlerweile verschiedenen Substanzklassen zuordnen, deren Verwendung als Markersignale möglich ist. In dieser Arbeit wurde die Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie dazu genutzt, um eine Substanzklassenverteilung des Leinwurzelextraktes und der Leinwurzel zu zeigen. Diese Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Steinbeis-Transferzentrum Soil Biotechnology, Rostock [75]. Der Ablauf der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Die Probe wird in einen Quarzriegel gefüllt. Bei der hier massenspektrometrisch zu analysierenden Probe handelt es sich jeweils um das ethanolische Rohextrakt der Leinwurzel in der Konzentration 100 mg/ml und um die Leinwurzel ohne Extraktion. Es werden etwa 0,2 bis 1,5 mg Probenmaterial verwendet. Mit einer Probenvorschubstange wird die Probe in die Ionenquelle eingebracht. Zusätzlich wird der Quarzriegel in einem Mikroheizer platziert. Dadurch erfolgt die schrittweise Hochheizung der Probe während der Pyrolyse. Hierbei erfolgt im Vakuum eine Aufspaltung der im Probenmaterial enthaltenen Biomakromoleküle in die chemischen Untereinheiten. Der Quarzriegelausgang zeigt senkrecht auf die Ionisierungseinheit. Diese besteht aus dem Emitter und der Saugblende. Nun gelangt das Pyrolysegas auf den Emitter. Dort wird den Molekülen ein Elektron entzogen. Die nun gebildeten positiv geladenen Ionen werden von dem Emitter abgestoßen, da dieser positiv geladen ist. Sie werden beschleunigt und gelangen durch die Saugblende in das Trennsystem. Die positiv geladenen Ionen werden durch weitere Blenden während des Durchgangs fokussiert. Schließlich gelangen sie zu einem elektrostatischen Feld. Hier werden alle auf das gleiche Energieniveau gebracht, das heißt sie bewegen sich anschließend in etwa gleicher Geschwindigkeit. Als nächstes gelangen die Ionen zum magnetischen Sektorfeld. Hier werden sie nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt. Dies erfolgt als Scan, das heißt es erfolgt die Veränderung des Feldes vom niedrigen zum hohen Magnetfeld. Zunächst gelangen die leichteren Ionen zum Detektor und dann die schwereren. Es wird bei diesem Verfahren von einer einfachen Ionisierung ausgegangen, das heißt das gemessene Masse-zu-Ladung-Verhältnis entspricht dem Molekulargewicht des Teilchens [34]. Der Detektor ist ein Sekundärelektronenvervielfacher. Erst trifft ein einzelnes Ion auf die Konversionsdynode. Dadurch werden weitere Elektronen generiert. Diese lösen in einer Kaskade durch weitere Dynoden eine Elektronenlawine aus [74]. Während der Aufheizphase von 110 bis 700 °C werden 91 einzelne Massenspektren aufgenommen und im Datensystem gespeichert [75] [6] [14].

2.2.15 Auswertung

Alle Versuche sind drei-bis viermal wiederholt worden. Dabei wurden die Extrakte, Extrakt- und Tamoxifengemische und die Positiv-und Negativkontrollen jeweils vierfach bestimmt. Nach Abzug des Blindwertes (nur bestehend aus Medium ohne Zellen) wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Beim LDH- Test wird durch Triton die maximale LDH-Freisetzung durch maximale Zellzerstörung herbeigeführt. Dies gilt als Referenzwert und der Extinktionswert von Triton wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen

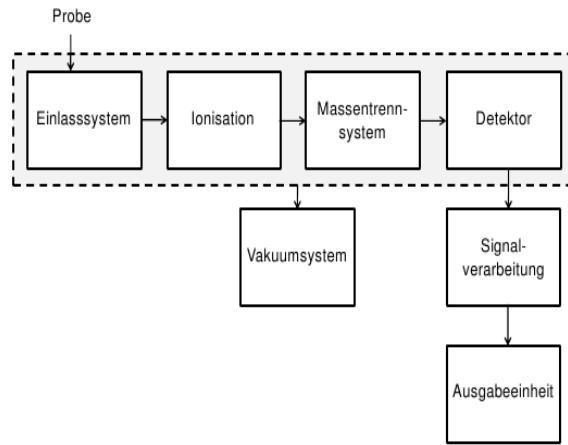


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [74].

Extinktionswerte prozentual auf diesen bezogen. Bei den MTT- und BrdU-Tests wurde die Negativ-Kontrolle 2 (Zellen und Ethanol) auf 100% gesetzt und alle anderen Extinktionswerte jeweils auf diesen Wert bezogen. Die Auswertung und die Berechnungen erfolgten mit OpenOffice.org Tabellenkalkulation und dem SPSS-Programm. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Post-Hoc-Test, um jeweils die Signifikanz der Ergebnisse bezüglich der Negativkontrolle 2 zu ermitteln. Alle Werte mit p kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle 2 und sind in den Diagrammen mit einem Sternchen (*) über dem Balken versehen.

Kapitel 3

Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Die hier verwendeten Zellen gehören zur Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Zuerst werden in diesem Teil die Ergebnisse der Zytotoxizitäts- und Proliferationstests gezeigt. Anschließend erfolgt die Auswertung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie sowie der Immunhistochemie.

3.1 Ergebnisse der Tests

Es werden die Ergebnisse der Proliferationstests BrdU und MTT und des Zytotoxizitätstests LDH an den Mammakarzinomzellen MCF-7 dargestellt. Es erfolgt eine übersichtliche graphische Darstellung der Ergebnisse (siehe jeweilige Abbildungen).

3.2 LDH-Test

Der Test zeigt die Zellzytotoxizität an. Eine Zunahme der Menge an toten Zellen korreliert mit einer Zunahme der Laktatdehydrogenase- Enzymaktivität im Zellüberstand. Dieses Enzym wird mit einem Antikörper markiert und durch eine Substratreaktion dargestellt.

In den Abbildungen 3.1 bis 3.12 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Abszissenachse zeigt die verschiedenen Extraktkonzentrationen, allein und jeweils zusammen mit Tamoxifen sowie die Kontrollen. Auf der Ordinatenachse wird der prozentuale Anteil der toten Zellen angegeben. Es zeigt sich der zytotoxische Einfluss der verschiedenen Konzentrationen des Leinwurzelextraktes auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestrucktion durch Triton. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt.

Es sind insgesamt vier LDH-Tests durchgeführt worden. Dabei waren die Versuchsbedingungen immer dieselben. Es sind zur genaueren Analyse nochmals Einzelwerte aus den bereits durchgeführten Versuchen herausgenommen und erneut untersucht oder neue Konzentrationen hinzugefügt worden. Jeder Versuch wurde einzeln ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt.

Erster LDH-Test mit den Konzentrationen des Leinwurzelextraktes von 0,005 µg/ml bis 50 µg/ml

Im ersten LDH-Test unterscheiden sich die Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe, 5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml jeweils signifikant von der Negativkontrolle.

Hier wird jedoch im Mittel die 20 %-Marke erreicht und die Konzentrationen zeigen somit keinen deutlichen zytotoxischen Effekt. Es zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Konzentration des Extraktes und der hemmenden Wirkung. Bei den verschiedenen Leinwurzelextrakten mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich in den Konzentrationen 0,005 µg/ml, 0,05, 5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml eine der ethanолischen Negativkontrolle gegenüber signifikante Zytotoxizität, jedoch im Mittel ebenfalls um die 20 %-Marke herum. Hierbei ist ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Leinwurzelkonzentration und der hemmenden Wirkung auf die Mammakarzinomzellen anzunehmen. Die maximale Zelldestruktion wird bei einer Leinwurzelkonzentration von 50 µg/ml ohne gleichzeitige Tamoxifengabe erreicht (30,44 %). Die zweitgrößte zytotoxische Wirkung wird bei einer Leinwurzelkonzentration von 50 µg/ml mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen (25,68 %) erreicht (siehe Abb.3.1).

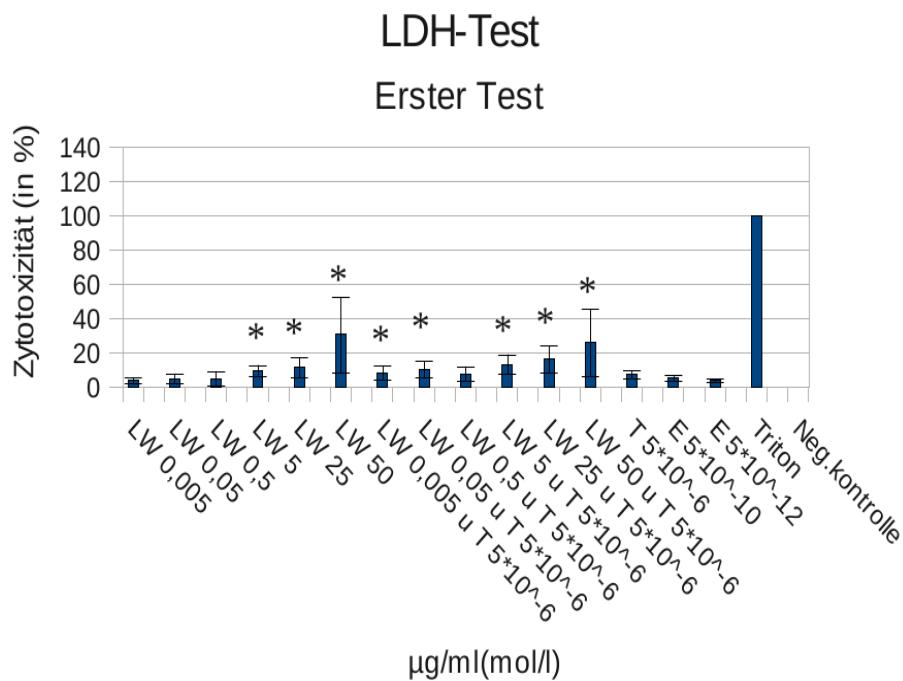


Abbildung 3.1: Erster LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.1: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte ± Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle (Zellen und Ethanol) mit 0 % Zytotoxizität und sind mit einem Sternchen (*) über dem Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen

in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt keine signifikante Zerstörung der Zellen gegenüber der Negativkontrolle (7,19 %). Vergleicht man nun die jeweiligen Werte der Leinwurzelextrakte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel, ohne Zusatz von Tamoxifen in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet. Hierbei kommt es zu einer höheren Zytotoxizität der Leinwurzel allein im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle. Auch in den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen kommt es in den Konzentrationen 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Tamoxifenkontrolle, wobei es auch hier zu einer höheren Zellzerstörung kommt (siehe Abb.3.2).

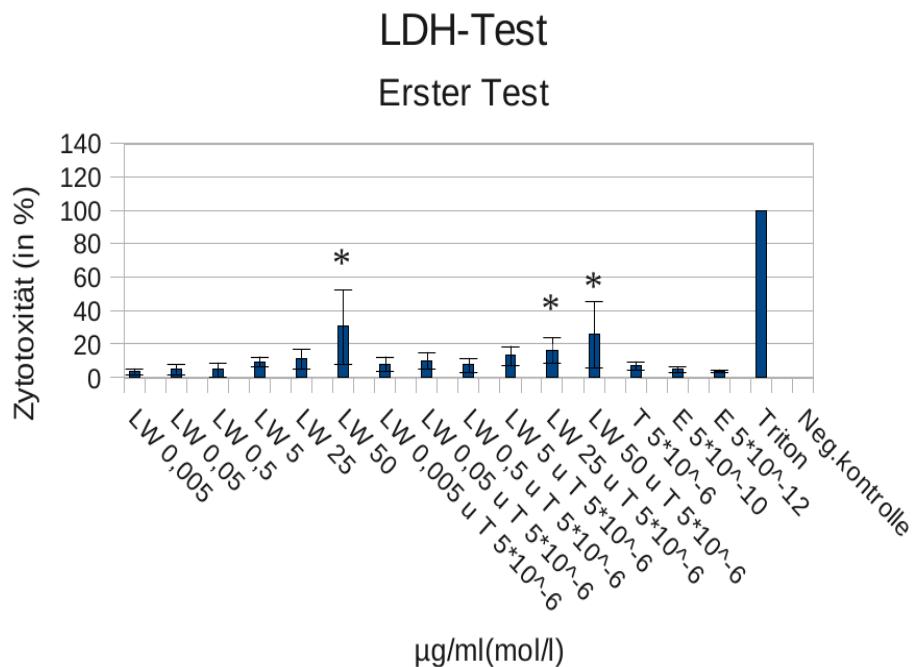


Abbildung 3.2: Erster LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.2: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit den

jeweiligen Konzentrationen der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass in keiner der Leinwurzelkonzentrationen mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) zu sehen ist (siehe Abb.3.3).

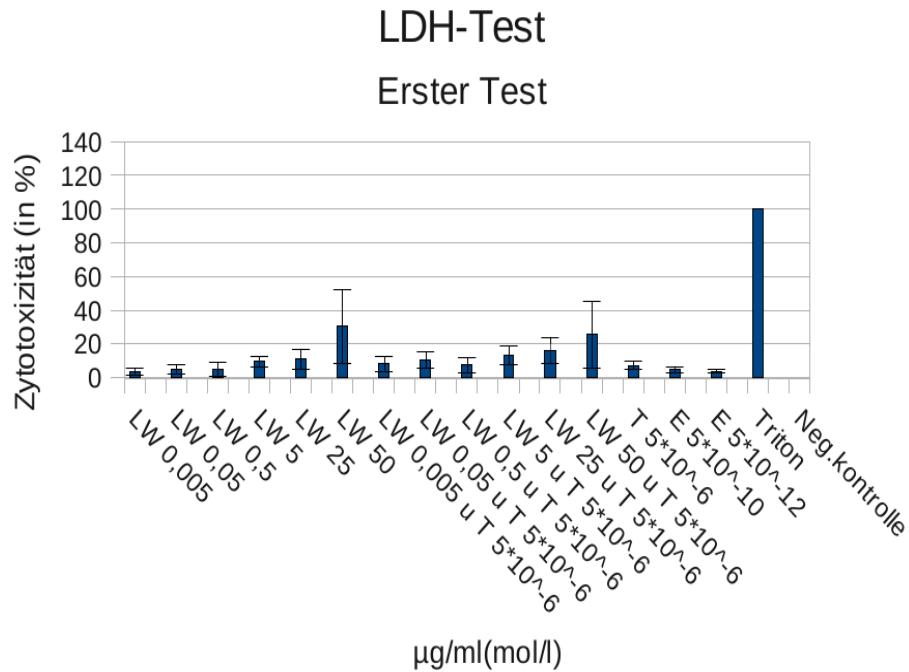


Abbildung 3.3: Erster LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.3: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, es unterscheiden sich keine Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt hier wie bereits beschrieben keine signifikante Zytotoxizität, bezogen auf die Negativkontrolle. Im gleichen Testansatz wurde neben den beiden Negativkontrollen eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in beiden Konzentrationen keine signifikante Zytotoxizität gegenüber der Negativkontrolle (siehe Abb.3.1).

Zweiter LDH-Test mit den Konzentrationen des Leinwurzelextraktes von 25 µg/ml und 50 µg/ml

Im zweiten LDH-Test sind die Konzentrationen der Leinwurzelextrakte 25 µg/ml und 50 µg/ml nochmal genauer untersucht worden.

In diesem Test unterscheidet sich die Konzentration der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe von 50µg/ml signifikant von der Negativkontrolle und zeigt somit eine vermehrte zytotoxische Wirkung an (von 24,11 %). Bei beiden Leinwurzelextrakten, 25 µg/ml und 50 µg/ml mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich ein der ethanolischen Negativkontrolle gegenüber signifikanter Unterschied (jeweils 43,71 %und 25,77%) (siehe Abb.3.4).

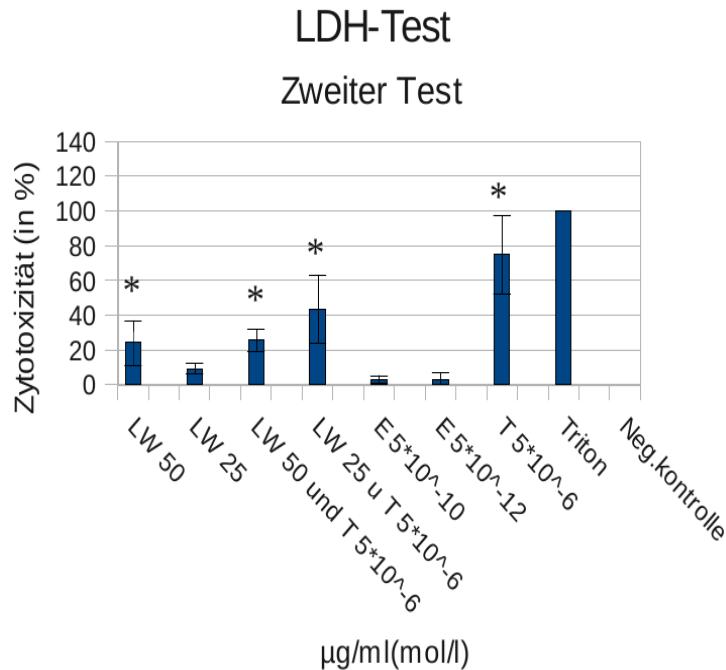


Abbildung 3.4: Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.4: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte ± Standardabweichung , alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle (Zellen und Ethanol) mit 0 % Zytotoxizität und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in µg/ml.

Die Ergebnisse sind in etwa ähnlich zu denen im ersten LDH-Test. Dort ist die Höhe der zytotoxischen Wirkung bei den beiden Konzentrationen, mit und ohne Tamoxifengabe, in etwa gleich. Außer bei der Konzentration von 25 µg/ml und gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen zeigt sich im zweiten Versuch eine höhere zytotoxische Wirkung.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt hier eine signifikante Zerstörung der Zellen gegenüber der Negativkontrolle von 74,95%. Vergleicht man nun die jeweiligen Werte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in allen Konzentrationen von der Leinwurzel allein ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet, wobei es hierbei zu einer geringeren Zytotoxizität im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kommt. Auch in den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen kommt es in den beiden Konzentrationen $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle, wobei es auch hier zu einer geringeren Zytotoxizität kommt (siehe Abb.3.5).

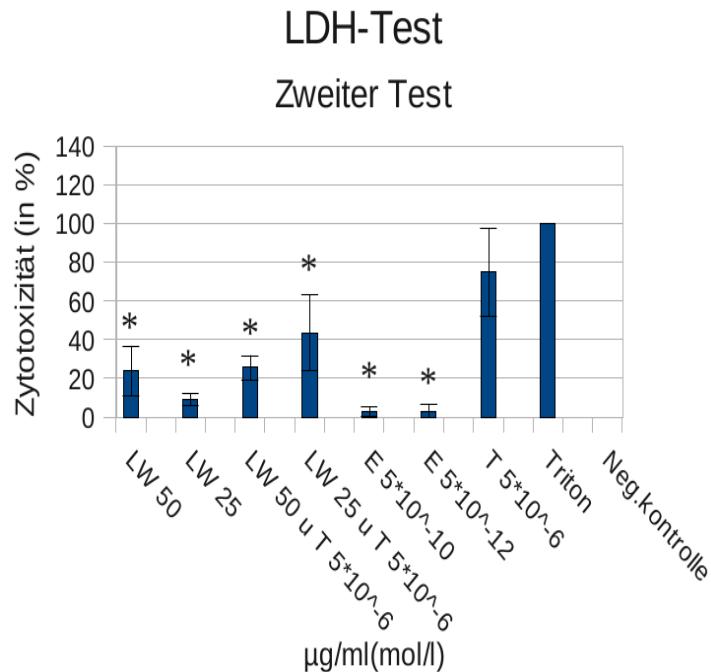


Abbildung 3.5: Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.5: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von 5×10^{-6}) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass in der Leinwurzelkonzentration von $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Leinwurzelextrakt allein) besteht. (siehe Abb.3.6).

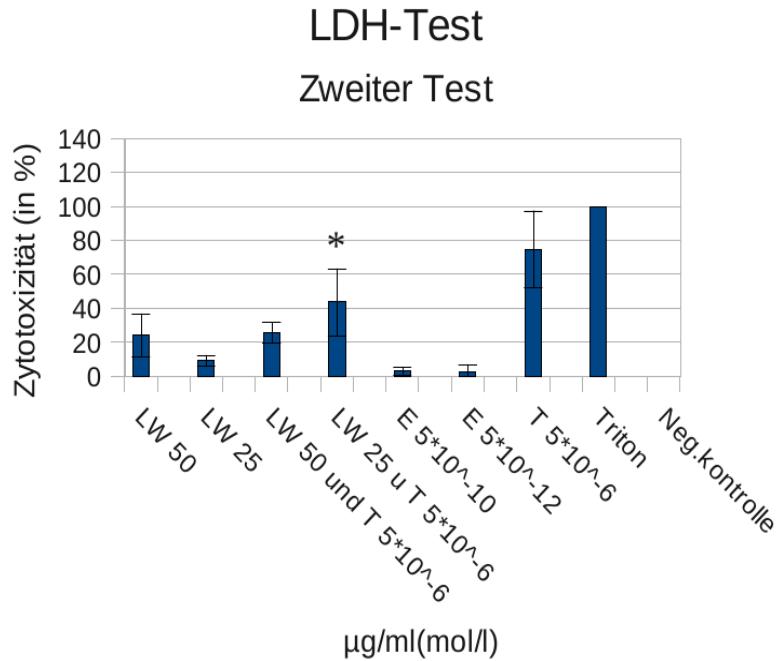


Abbildung 3.6: Zweiter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.6: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterscheiden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gleichen Testansatz wurde neben der Tamoxifenkontrolle eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in beiden Konzentrationen keine signifikante Zytotoxizität (siehe Abb. 3.4).

Dritter LDH-Test mit den Konzentrationen des Leinwurzelextraktes von 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Im dritten LDH-Test wurden die Konzentrationen der Leinwurzel 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genauer untersucht.

In diesem Test unterscheiden sich beide Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant von der Negativkontrolle und zeigen somit eine vermehrte Zellzytotoxizität an. Hierbei zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Leinwurzelkonzentration und der Zytotoxizität. Bei den verschiedenen Leinwurzelextrakten mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich ebenfalls in beiden Konzentrationen

eine der ethanolischen Negativkontrolle gegenüber signifikante Zytotoxizität. Hierbei zeigt sich ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen Konzentration und Höhe der Zytotoxizität.

Die höchste zytotoxische Wirkung zeigt sich bei der gleichzeitigen Gabe von Leinwurzel mit einer Konzentration von 250 µg/ml und Tamoxifen von insgesamt 58,97 %. Die zweithöchste Zytotoxizität zeigt die Leinwurzelkonzentration ohne Tamoxifen von 250 µg/ml (48,95%) an (siehe Abb.3.7).

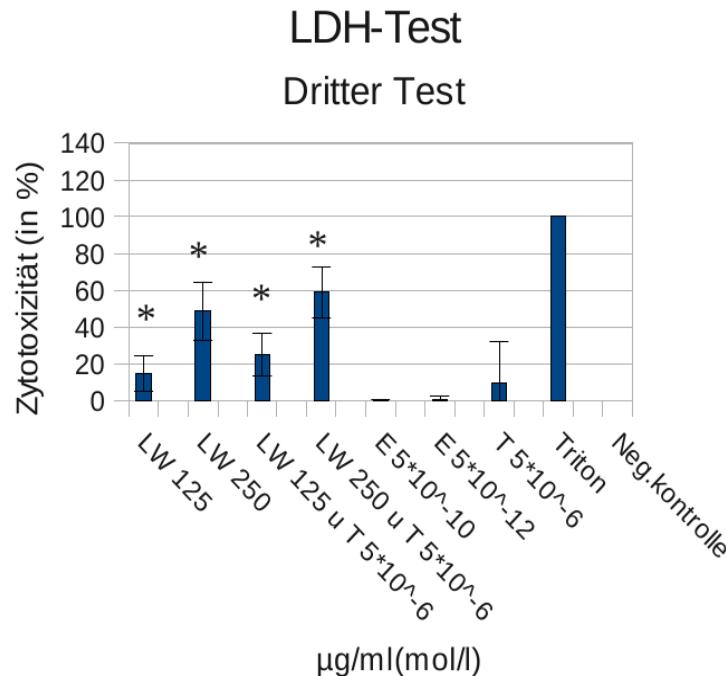


Abbildung 3.7: Dritter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.7: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte ± Standardabweichung , alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle (Zellen und Ethanol) mit 0 % Zytotoxizität und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in µg/ml.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt hier keine signifikante Zerstörung der Zellen gegenüber der Negativkontrolle an (9,67 %).

Vergleicht man nun die jeweiligen Werte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in einer Konzentration von 250 µg/ml signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet, wobei es hierbei zu einer höheren Zytotoxizität im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kommt. In den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen kommt es in den beiden Konzentra-

tionen $125\mu\text{g}/\text{ml}$ und $250\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle, wobei es auch hier zu einer höheren Zytotoxizität kommt (siehe Abb.3.8).

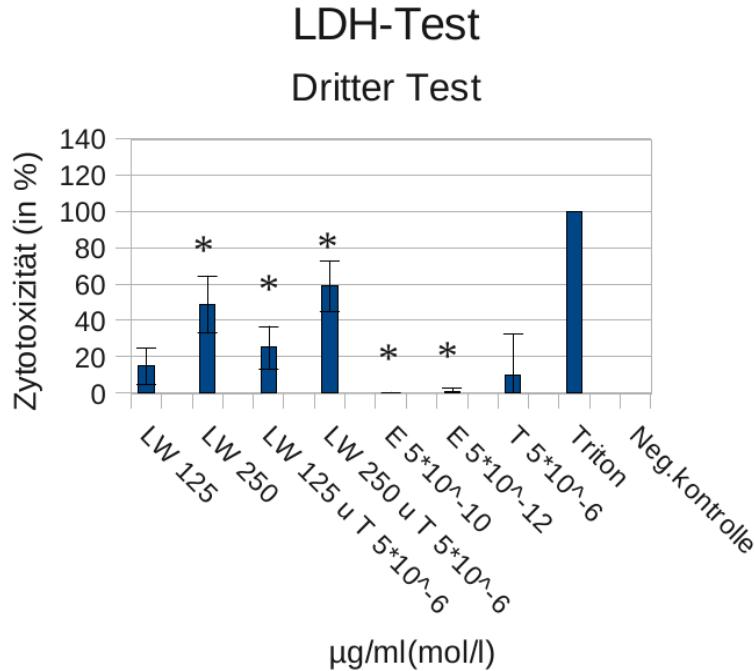


Abbildung 3.8: Dritter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.8: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass in beiden Leinwurzelkonzentrationen mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) besteht. Die gemeinsame Gabe der beiden Substanzen zeigt einen höheren zytotoxischen Effekt (siehe Abb.3.9).

Kommentar zur Abbildung 3.9: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unter-

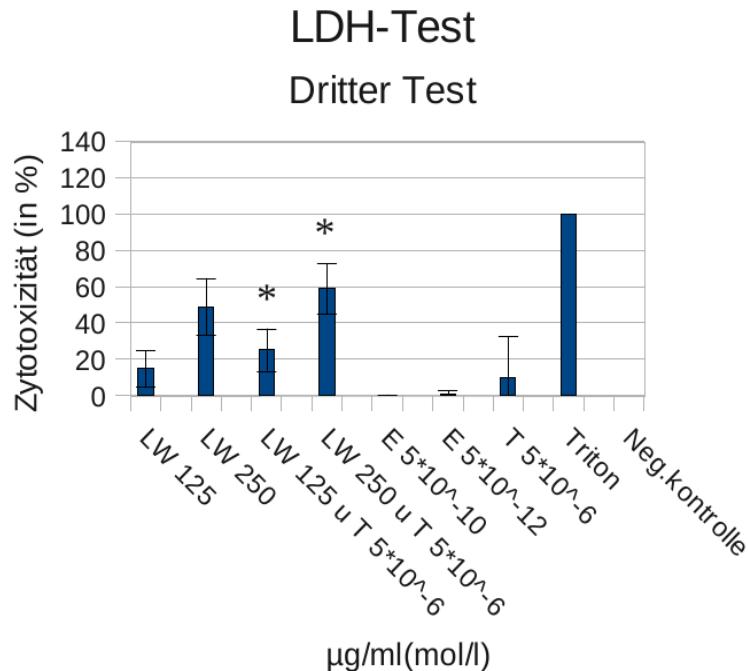


Abbildung 3.9: Dritter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

scheiden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gleichen Testansatz wurde neben der Tamoxifenkontrolle eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in beiden Konzentrationen keine signifikante Zytotoxizität an (siehe Abb. 3.7).

Vierter LDH-Test mit den Konzentrationen des Leinwurzelextraktes von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Im vierten LDH-Test wurden außer den bereits bekannten die Konzentrationen der Leinwurzel von 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genauer untersucht.

In diesem Test unterscheiden sich alle Konzentrationen der Leinwurzel allein, ohne Tamoxifenzugabe (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Bei den verschiedenen Leinwurzelextrakten mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich in den Konzentrationen 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine der ethanolisches Negativkontrolle gegenüber signifikante zytotoxische Wirkung. Die höchste zytotoxische Wirkung zeigt sich bei der gleichzeitigen Gabe von Leinwurzel mit einer Konzentration von 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und Tamoxifen von insgesamt 30,55 %. Die zweithöchste zelltötende Wirkung zeigt die Leinwurzelkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zusammen mit Tamoxifen (20,46%) (siehe

Abb.3.10).

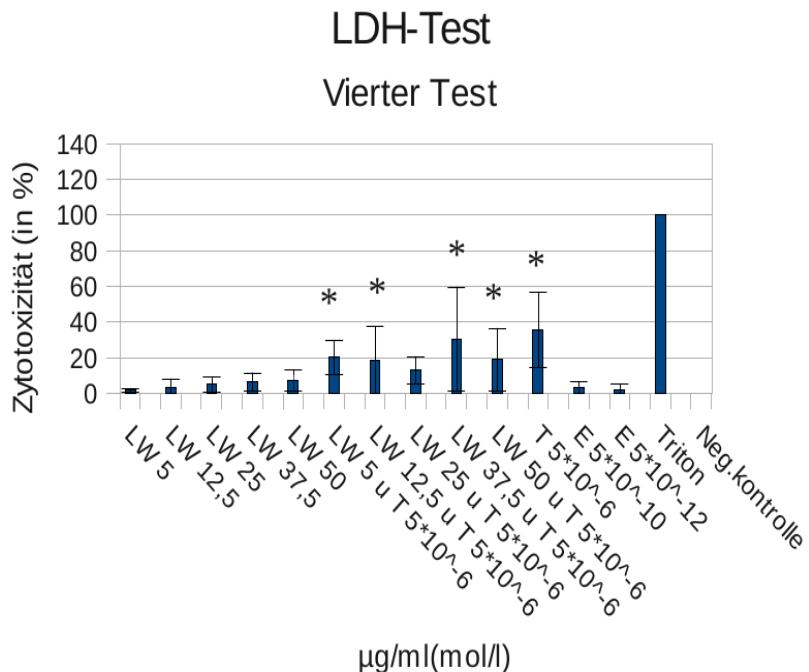


Abbildung 3.10: Vierter LDH-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.10: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung , alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle (Zellen und Ethanol) mit 0 % Zytotoxizität und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Hier sind die Ergebnisse der alleinigen Leinwurzelgabe bei den Konzentrationen 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ unterschiedlich, im Vergleich zum ersten LDH-Test. Es zeigt sich im vierten Test insgesamt eine schwächere Wirkung auf die Zellen im Vergleich zum ersten Test. Bei der gemeinsamen Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt sind die Ergebnisse ähnlich.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt hier die insgesamt höchste signifikante Zerstörung der Zellen gegenüber der Negativkontrolle von 35,84 %. Vergleicht man nun die jeweiligen Werte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in allen Konzentrationen von der Leinwurzel allein (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet, wobei es hierbei zu einer geringeren Zytotoxizität im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kommt. Auch in den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe

von Tamoxifen kommt es in fast allen Konzentrationen (außer $37,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle, wobei es auch hier zu einer geringeren Zytotoxizität kommt (siehe Abb.3.11).

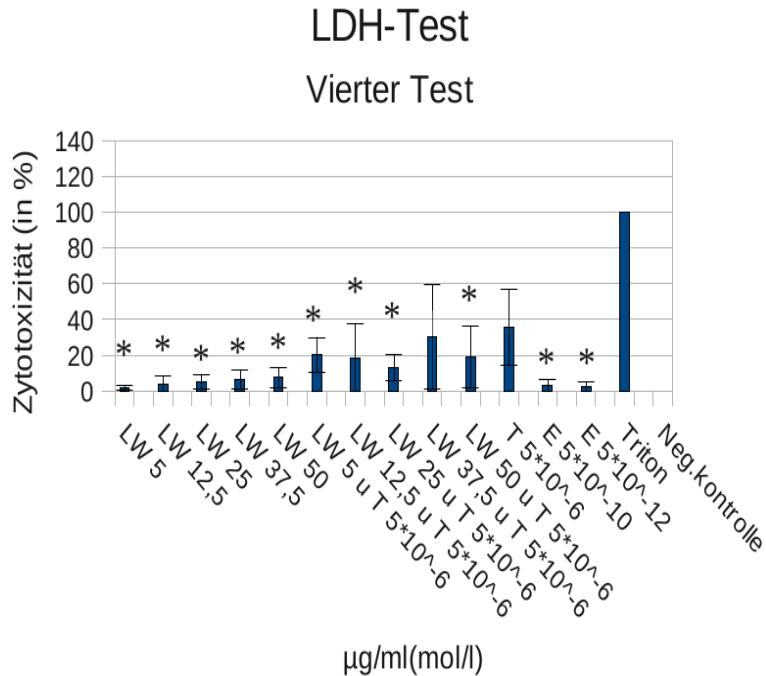


Abbildung 3.11: Vierter LDH-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.11: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestrucktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass in den Leinwurzelkonzentrationen $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $12,5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $37,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) besteht. Bei der gemeinsamen Gabe der beiden Substanzen ist die zytotoxische Wirkung auf die Zellen höher (siehe Abb.3.12).

Kommentar zur Abbildung 3.12: Zytotoxischer Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur

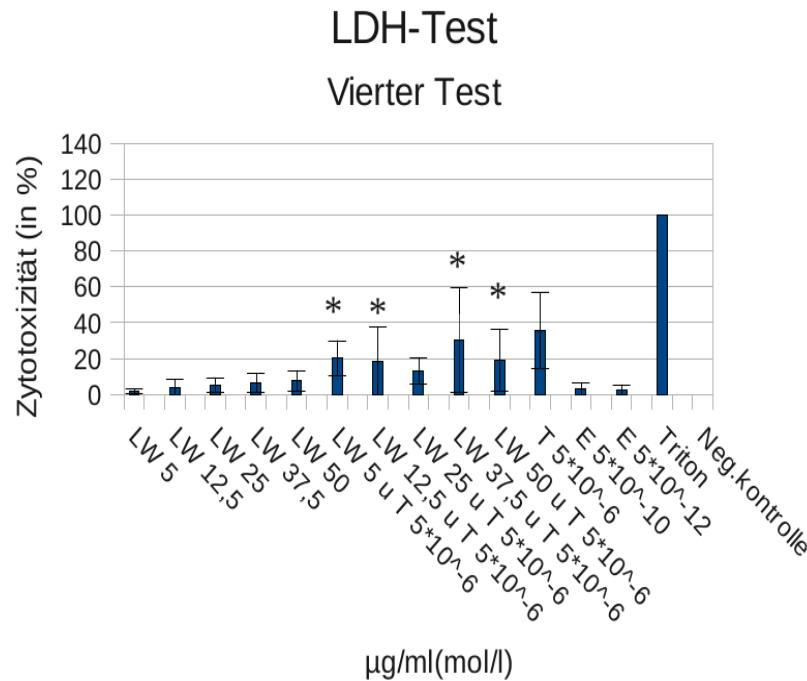


Abbildung 3.12: Vierter LDH-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton, Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gleichen Testansatz wurde auch hier neben der Tamoxifenkontrolle eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in beiden Konzentrationen keine signifikante Zytotoxizität (siehe Abb. 3.10).

Zusammenfassung der Ergebnisse im LDH-Test

Zusammenfassend lässt sich also zu allen durchgeführten LDH-Tests sagen, dass sich bei gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle ein verstärkender zytotoxischer Effekt im ersten und dritten LDH-Test zeigt. Im zweiten und vierten Test ist eine eher abschwächende zytotoxische Wirkung im Vergleich zur alleinigen Gabe des Tamoxifens zu sehen. Die gemeinsame Gabe der beiden Substanzen zeigt gegenüber der Leinwurzelkontrolle im ersten LDH-Test keinen Unterschied, im zweiten bis vierten Test eine verstärkende zytotoxische Wirkung, wobei die jeweiligen Tamoxifenwerte vor allem im LDH-Test unterschiedlich hoch ausfallen, worauf in Abschnitt 4.4.2. noch eingegangen wird.

3.3 MTT-Test

Mit dem MTT-Test können qualitative und quantitative Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Zellen unter dem Einfluss der Extrakte in ihren jeweiligen Konzentrationen und unter dem Zusatz von Tamoxifen getroffen werden. In den Abbildungen 3.13 bis 3.18 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Abszissenachse zeigt die verschiedenen Extraktkonzentrationen, allein und jeweils zusammen sowie die Kontrollen. Auf der Ordinatenachse wird der prozentuale Anteil der Vitalität der Zellen angegeben. Die Diagramme zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Es sind insgesamt zwei MTT-Tests durchgeführt worden. Dabei waren die Versuchsbedingungen immer dieselben. Zur genaueren Analyse wurden im zweiten Test nochmals Einzelwerte herausgenommen und erneut untersucht und weitere Konzentrationen dazugenommen. Jeder Versuch wurde einzeln ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt.

Erster MTT-Test mit den Leinwurzelextraktkonzentrationen von 0,01 µg/ml bis 500 µg/ml

Im ersten MTT-Test unterscheiden sich die Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe, 250 µg/ml und 500 µg/ml jeweils signifikant von der Negativkontrolle und zeigen somit eine Wachstumshemmung um jeweils 15 % und 44,5 % an. Hiermit ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Konzentration des Extraktes und der Hemmung der Proliferation der Zellen anzunehmen. Die Leinwurzelkonzentration von 50 µg/ml zeigt eher eine Wachstumsförderung um 9,5 %, welche ebenfalls signifikant ist. Die übrigen Konzentrationen der Leinwurzelextrakte zeigen keine signifikante Hemmung beziehungsweise Förderung der Proliferation der Zellen gegenüber der Negativkontrolle.

Bei den verschiedenen Leinwurzelextrakten mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich in allen Konzentrationen (0,01µg/ml, 1µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml 100 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml) eine der ethanolischen Negativkontrolle gegenüber signifikante Hemmung der Proliferation. Hierbei ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Leinwurzelkonzentration und der Hemmung der Proliferation der Mammakarzinomzellen anzunehmen. Auch die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt eine signifikante Hemmung des Wachstums der Zellen gegenüber der Negativkontrolle um 36,35 %. Eine maximale Hemmung des Zellwachstums wird unter der höchsten verwendeten Leinwurzelkonzentration von 500 µg/ml und gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen (um 52,13 %) erreicht. Die zweitgrößte Hemmung wird unter der höchsten alleinigen Gabe der Leinwurzel in höchster Konzentration von 500 µg/ml (um 44,5 %) erreicht (siehe Abb.3.13).

Kommentar zur Abbildung 3.13: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte ± Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit a = 5 %) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in µg/ml.

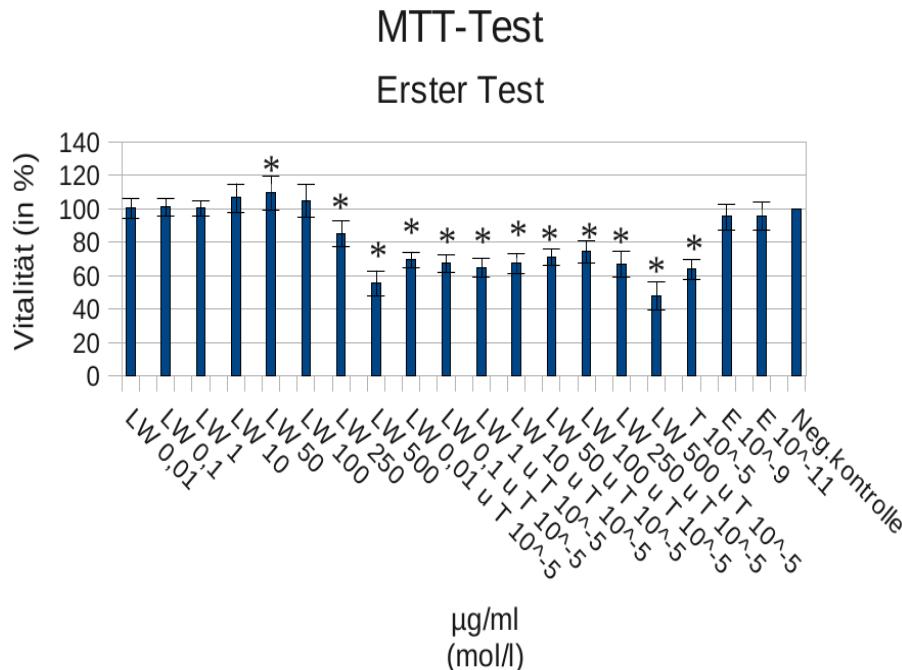


Abbildung 3.13: Erster MTT-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Vergleicht man nun die jeweiligen Werte der Leinwurzelextrakte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich hier die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in allen Konzentrationen ($0.01\mu\text{g}/\text{ml}$, $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ $100\mu\text{g}/\text{ml}$, $250\mu\text{g}/\text{ml}$ und $500\mu\text{g}/\text{ml}$) signifikant von Tamoxifen unterscheidet, wobei es nur bei der Leinwurzelkonzentration von $500\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einer größeren Hemmung der Proliferation kommt als beim Tamoxifen allein. Bei der Leinwurzelgabe mit gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen besteht bei den Konzentrationen $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ und $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ein signifikanter Unterschied zu Tamoxifen, wobei lediglich die Konzentrationen von $500\mu\text{g}/\text{ml}$ eine stärkere Hemmung als das Tamoxifen allein zeigt (siehe Abb. 3.14).

Kommentar zur Abbildung 3.14: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit $P < 0.05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet T = Tamoxifen in mol/l , E = Estradiol in mol/l , LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass alle Leinwurzelkonzentrationen ($0.01\mu\text{g}/\text{ml}$, $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ $100\mu\text{g}/\text{ml}$,

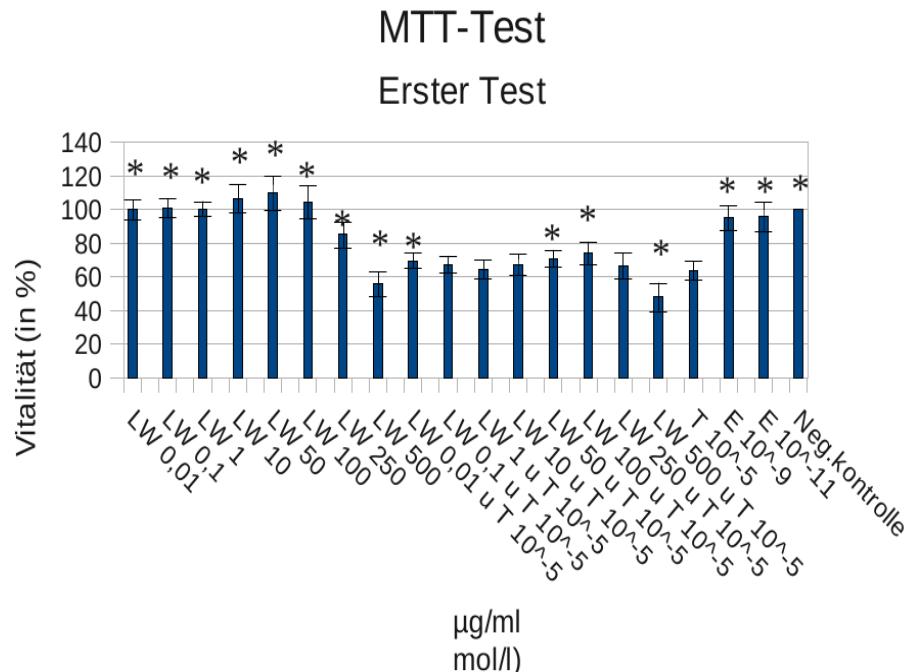


Abbildung 3.14: Erster MTT-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) zeigen. Hier zeigt sich jeweils eine stärkere Proliferationshemmung bei Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen. (siehe Abb 3.15).

Kommentar zur Abbildung 3.15: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5 \%$) unterschieden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gleichen Testansatz wurde neben der Negativkontrolle eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die Tamoxifengabe allein gilt hier auch als Negativkontrolle. Das 17β -Östradiol zeigt in keiner Konzentration eine signifikante Proliferationsförderung. Die Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-9}$ und $1 \cdot 10^{-11}$ mol/l bewirken eine geringfügige Hemmung der Proliferation um maximal 4,97% (Abb.3.13).

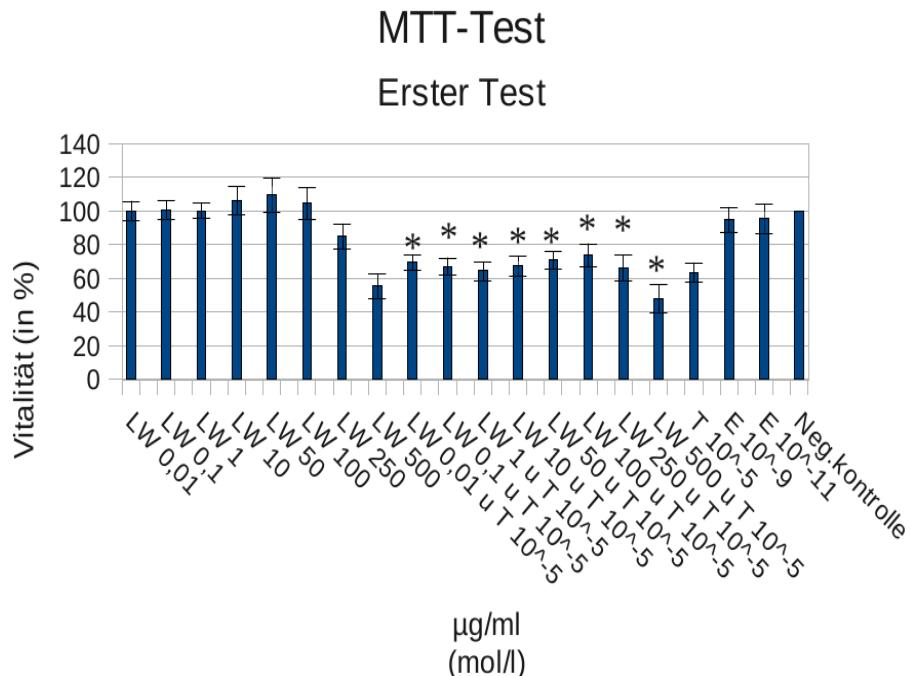


Abbildung 3.15: Erster MTT-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Zweiter MTT-Test mit den Leinwurzelextraktkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Im zweiten MTT-Test wurden weitere Konzentrationen der Leinwurzel untersucht (jeweils noch 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$), um mögliche feine Unterschiede zu erkennen. Im Test unterscheiden sich alle Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jeweils signifikant von der Negativkontrolle und zeigen eher eine Wachstumsförderung im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Leinwurzelkonzentrationen mit Tamoxifengabe unterscheiden sich alle nicht signifikant von der Negativkontrolle. Auch die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt hier keine signifikante Hemmung der Zellen gegenüber der Negativkontrolle. Eine maximale Hemmung des Zellwachstums wird unter der Leinwurzelkonzentration von 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen (um 2,68 %) erreicht. (siehe Abb. 3.16).

Kommentar zur Abbildung 3.16: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die jeweiligen Werte der Leinwurzelextrakte mit der alleinigen Gabe

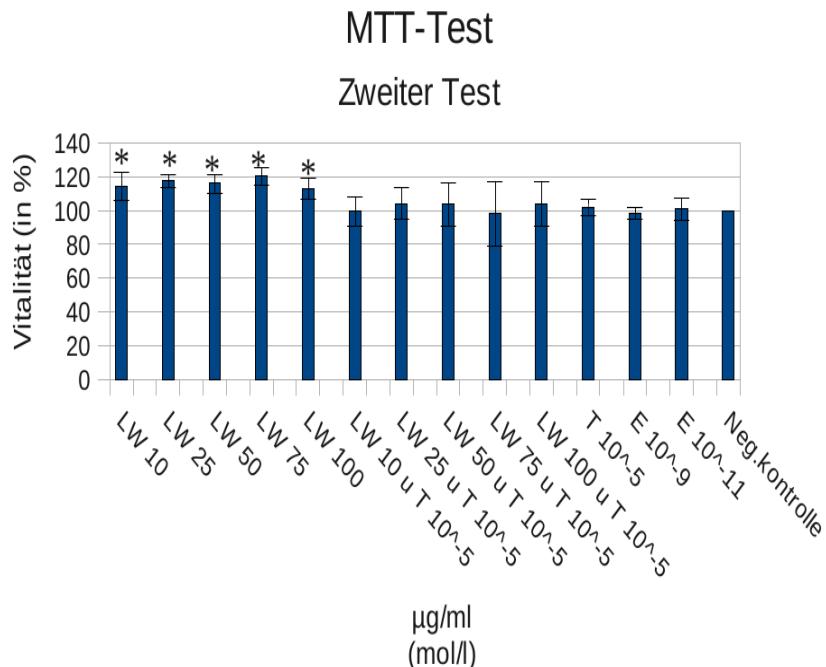


Abbildung 3.16: Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in allen Konzentrationen ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) signifikant von Tamoxifen unterscheidet. Hierbei kommt es eher zu einer Förderung der Proliferation im Vergleich zum Tamoxifen (siehe Abb.3.17).

Kommentar zur Abbildung 3.17: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $a = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass alle Leinwurzelkonzentrationen ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) zeigen. Hier zeigt sich jeweils eine stärkere Proliferationshemmung bei Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen, die signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle ist. (siehe Abb.3.18).

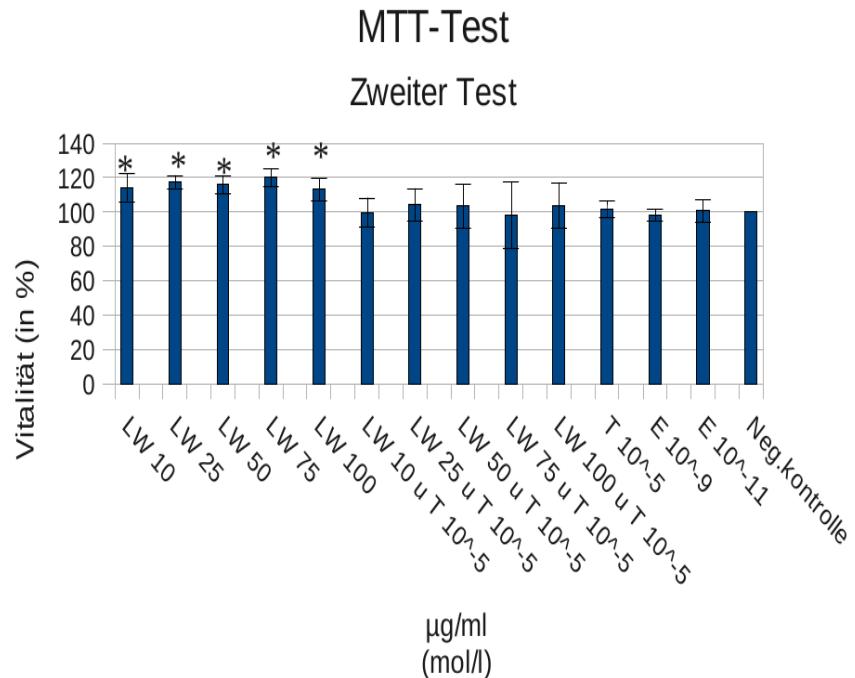


Abbildung 3.17: Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

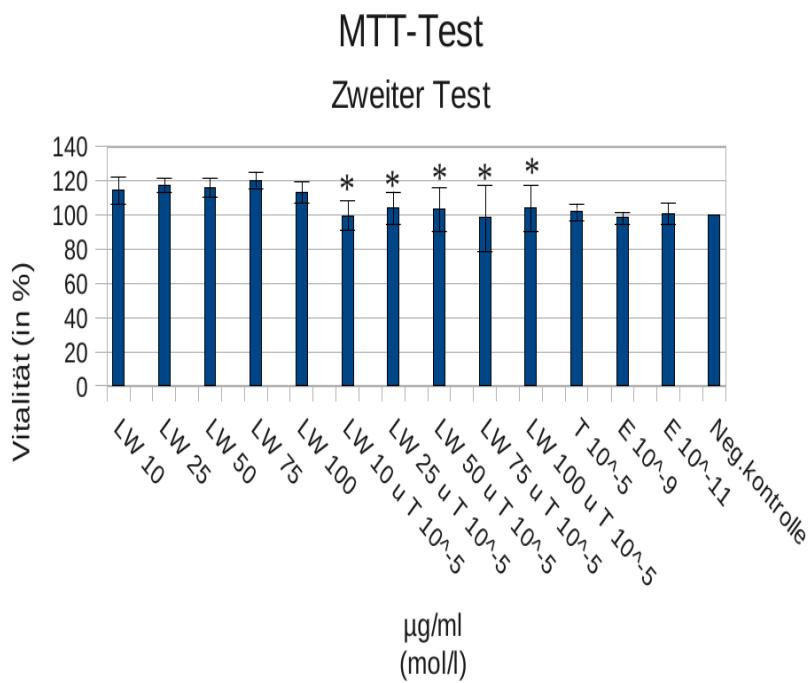


Abbildung 3.18: Zweiter MTT-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.18: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (MTT-Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterschieden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gleichen Testansatz wurde auch hier neben der Negativkontrolle Tamoxifen eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in keiner Konzentration eine signifikante Proliferationsförderung. Die Konzentrationen $1 \cdot 10^{-9}$ und $1 \cdot 10^{-11}$ mol/l bewirken eine geringfügige Hemmung der Proliferation um maximal 1,56% (Abb 3.16).

Zusammenfassung der Ergebnisse im MTT-Test

Zusammenfassend lässt sich also zu beiden durchgeführten MTT-Tests sagen, dass sich bei gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kein wesentlicher Unterschied im ersten Test zeigt. Im zweiten Test ist eher eine zunehmende Proliferation im Vergleich zur alleinigen Gabe des Tamoxifens zu sehen. Die gemeinsame Gabe der beiden Substanzen zeigt gegenüber der Leinwurzelkontrolle in beiden MTT-Tests eine verstärkende proliferationshemmende Wirkung.

3.4 BrdU-Test

Mit dem BrdU-Test können Aussagen über das Zellwachstum nach Extrakteinwirkung getroffen werden. Die DNA-Synthese in den Zellkulturen wird dabei als direkter Parameter des Zellwachstums betrachtet. In den Abbildungen 3.19 bis 3.24 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Abszissenachse zeigt die verschiedenen Extraktkonzentrationen, allein und jeweils zusammen sowie die Kontrollen. Auf der Ordinatenachse wird der prozentuale Anteil der Zellproliferation angegeben. Die Diagramme zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Erster BrdU-Test mit den Leinwurzelextraktkonzentrationen von 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Der erste BrdU-Test zeigt, wie bereits der MTT-Test, einen Rückgang der Zellproliferation, hier auch schon bei geringeren Konzentrationen. In diesem BrdU-Test unterschieden sich die Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jeweils signifikant von der ethanolischen Negativkontrolle und zeigen somit eine Hemmung des Zellwachstums an. Hiermit ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Konzentration des Extraktes und der Hemmung der Proliferation der Zellen anzunehmen, wobei die Leinwurzelkonzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hier keine signifikante Wachstumshemmung zeigt.

Bei den verschiedenen Leinwurzelextrakten mit gleichzeitiger Zugabe von Tamoxifen zeigt sich in fast allen Konzentrationen ($1\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ und $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$) eine der ethanolischen Negativkontrolle gegenüber signifikante Hemmung der Proliferation. Hierbei ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Leinwurzelkonzentration und der Hemmung der Proliferation der Mammakarzinomzellen anzunehmen, wobei auch hier die höchste Leinwurzelkonzentration von $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ keine signifikante Proliferationshemmung im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen zeigt. Eine maximale Hemmung der Proliferation wird unter der Leinwurzelkonzentration allein ohne Tamoxifenzugabe von $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht (um maximal 78,15 %). Die zweitgrößte Hemmung wird durch die Leinwurzelkonzentration $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in gleichzeitiger Gabe mit Tamoxifen erreicht (um maximal 72,62%) (siehe Abb.3.19).

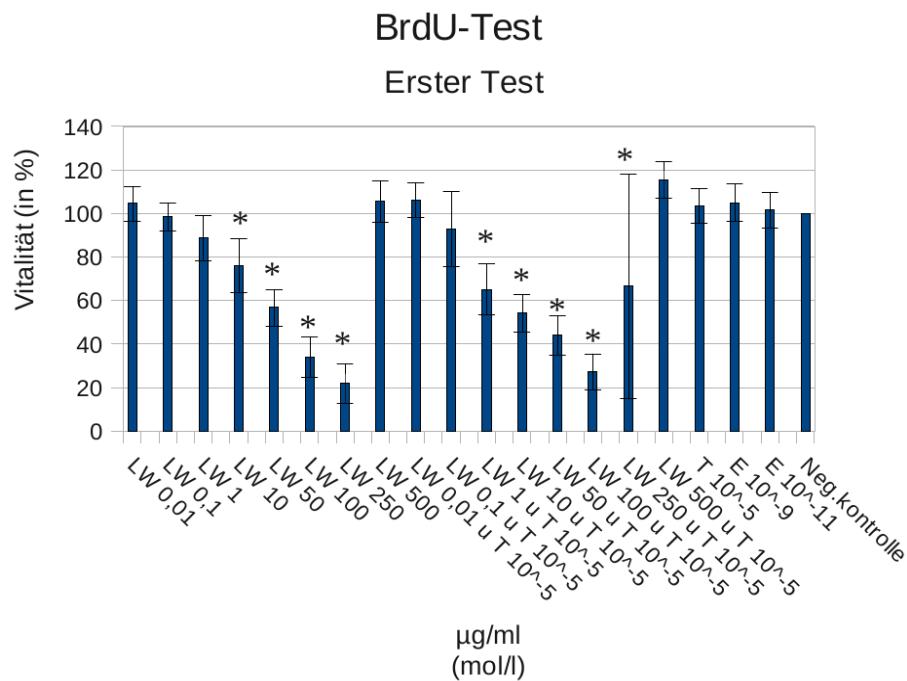


Abbildung 3.19: Erster BrdU-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.19: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen als Negativkontrolle zeigt keine Wachstumshemmung, die signifikant ist. Vergleicht man nun die jeweiligen Werte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Wirkung der Leinwurzel ohne Zusatz von Ta-

moxifen in den Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet, wobei es jeweils auch zu einer Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kommt. Auch in den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen kommt es in den Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Tamoxifenkontrolle, wobei es außer bei der Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ zu einer Hemmung der Proliferation kommt (siehe Abb.3.20).

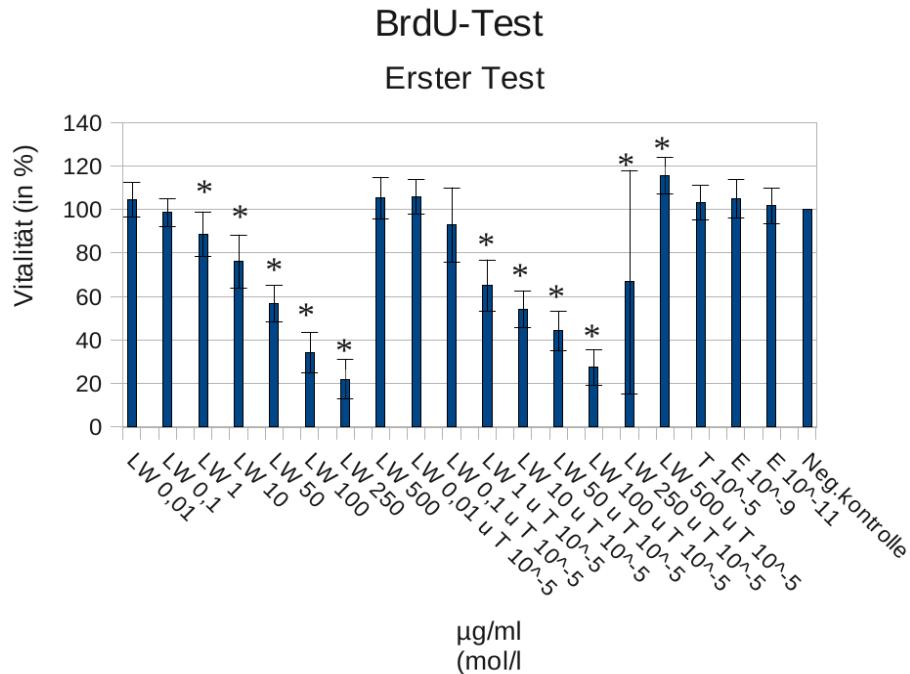


Abbildung 3.20: Erster BrdU-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.20: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von 1×10^{-5}) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass die Leinwurzelkonzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $250 \mu\text{g}/\text{ml}$, mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) zeigen. Hier zeigt sich jeweils eine stärkere Proliferationshemmung bei Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen, außer bei der

Konzentration von 250 mg/ml, hier zeigt die alleinige Gabe von der Leinwurzel eine höhere Proliferationshemmung. (siehe Abb.3.21).

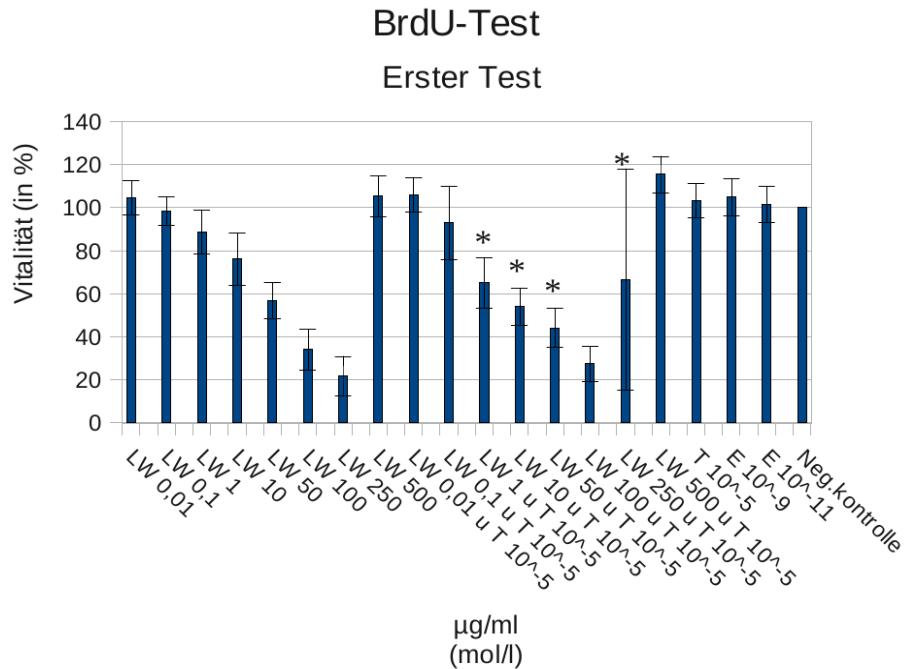


Abbildung 3.21: Erster BrdU-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.21: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterschieden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen als Negativkontrolle wie bereits beschrieben zeigt keine Wachstumshemmung, die signifikant ist. Es zeigt sich hier eher sogar eine geringe Förderung des Wachstums von maximal 3,35%. Im gleichen Testansatz wurde eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Östradiol zeigt in beiden Konzentrationen eine geringfügige nicht signifikante Proliferationsförderung von maximal 5,04%. (siehe Abb.3.19).

Zweiter BrdU-Test mit den Leinwurzelextraktkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Im zweiten BrdU-Test wurden weitere Konzentrationen der Leinwurzel untersucht (jeweils noch 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$), um mögliche feine Unterschiede zu erkennen. In diesem BrdU-

Test unterscheiden sich alle Konzentrationen der Leinwurzel allein ohne Tamoxifenzugabe ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) jeweils signifikant von der ethanolischen Negativkontrolle und zeigen somit eine Hemmung des Zellwachstums. Hiermit ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Konzentration des Extraktes und der Hemmung der Proliferation der Zellen anzunehmen.

Auch alle Leinwurzelkonzentrationen mit der jeweiligen gleichzeitigen Gabe von Tamoxifen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle und auch hier ist eine Korrelation zwischen Konzentration und Wachstumshemmung anzunehmen. Eine maximale Hemmung der Proliferation wird unter der Leinwurzelkonzentration von $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ und Tamoxifen zusammen erreicht (um 85,41 %). Die zweitgrößte Hemmung der Zellproliferation wird erreicht bei einer Konzentration von $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und Tamoxifen zusammen (um 82,6 %). Die größte Hemmung bei der Gabe von Leinwurzelextrakt allein wird erreicht bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ (um 76,46 %). Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt keine Wachstumshemmung, die signifikant ist (siehe Abb.3.22).

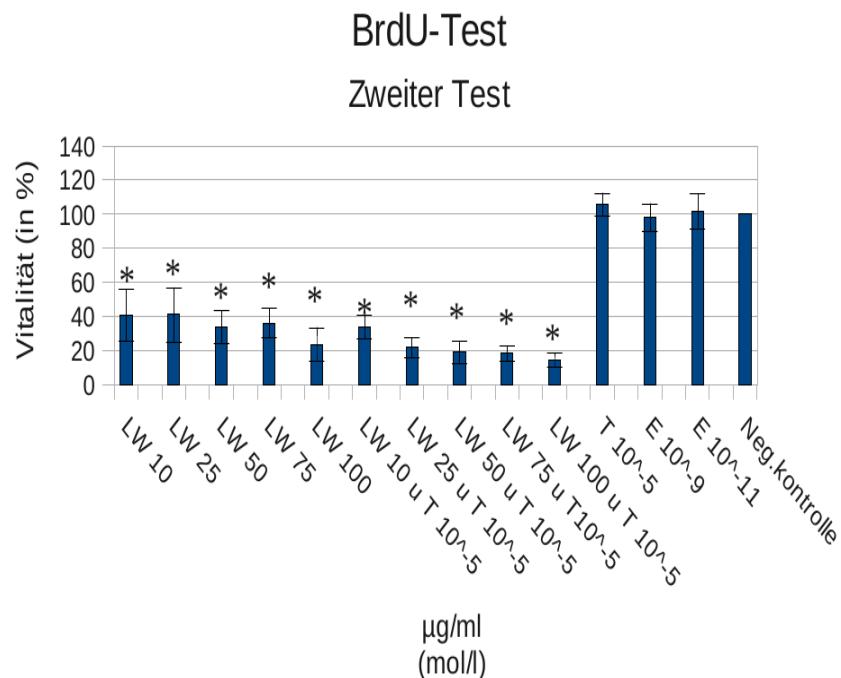


Abbildung 3.22: Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen und Ethanol).

Kommentar zur Abbildung 3.22: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die jeweiligen Werte mit der alleinigen Gabe von Tamoxifen, so stellt sich heraus, dass sich die Leinwurzel ohne Zusatz von Tamoxifen in allen Konzentrationen ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) signifikant von der Tamoxifenkontrolle unterscheidet, wobei es jeweils auch zu einer Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle kommt. Auch in den Leinwurzelkonzentrationen jeweils mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen kommt es in den Konzentrationen $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen, wobei es zu einer Verminderung der Proliferation kommt (siehe Abb. 3.23).

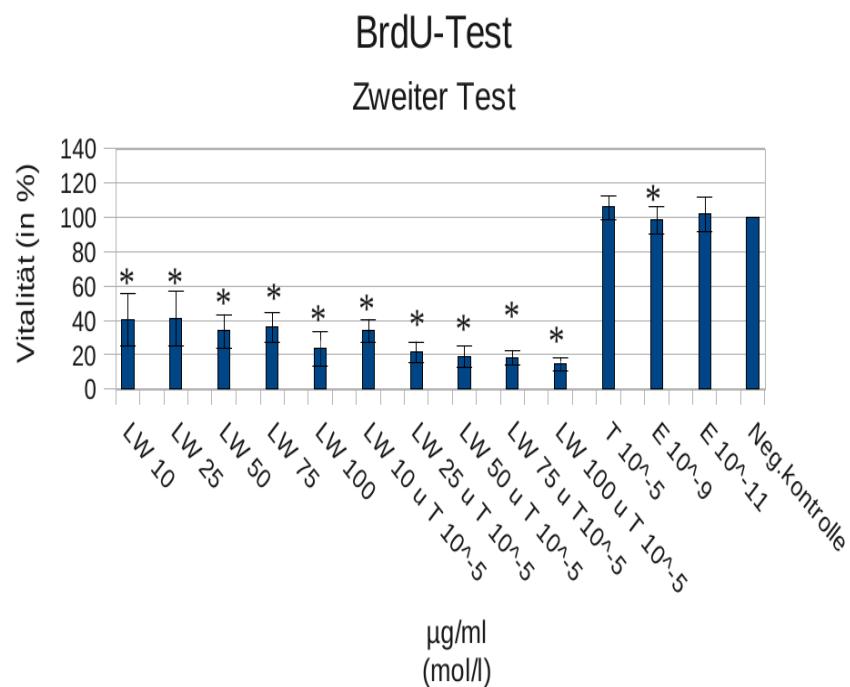


Abbildung 3.23: Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Tamoxifenkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.23: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Tamoxifenkontrolle (in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$) und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Vergleicht man nun die verschiedenen Leinwurzelkonzentrationen jeweils allein mit der jeweiligen Konzentration der Leinwurzel und gleichzeitigem Zusatz von Tamoxifen, so zeigt sich, dass in allen Leinwurzelkonzentrationen ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen jeweils ein signifikanter Unterschied

zur jeweiligen Kontrolle (Leinwurzelextrakt in jeweiliger Konzentration allein) besteht. Hier zeigt sich jeweils eine stärkere Proliferationshemmung bei Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen zusammen. Hier zeigt die alleinige Gabe von der Leinwurzel eine höhere Proliferationshemmung (siehe Abb.3.24).

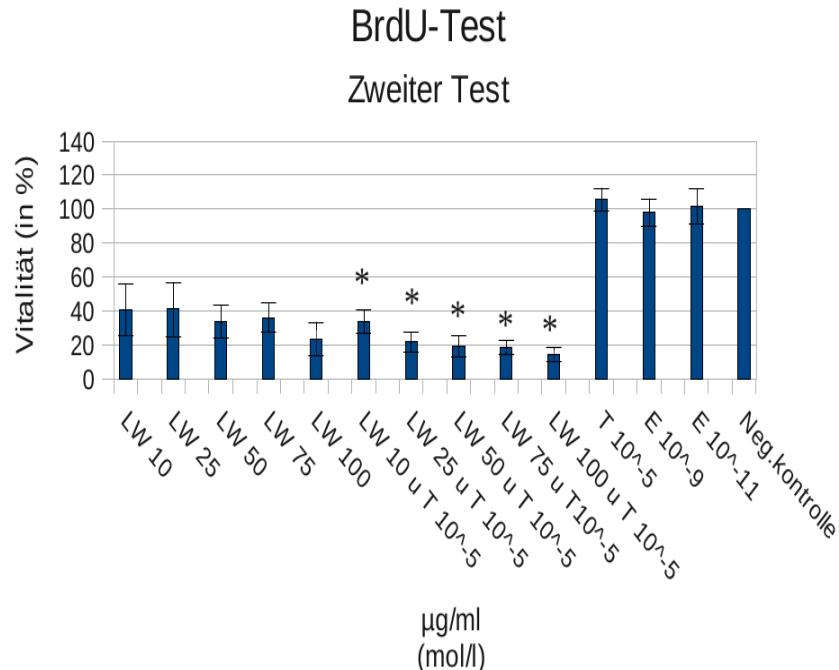


Abbildung 3.24: Zweiter BrdU-Test, Vergleich zur Leinwurzelextraktkontrolle.

Kommentar zur Abbildung 3.24: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Leinwurzelextraktes (BrdU-Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol), Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle Werte mit P kleiner 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterschieden sich jeweils signifikant von der jeweiligen gleichen Konzentration der Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifenzugabe und sind mit einem Sternchen (*) über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet, T = Tamoxifen in mol/l, E = Estradiol in mol/l, LW = Leinwurzelextrakt in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die alleinige Gabe von Tamoxifen zeigt wie bereits beschrieben keine Proliferationshemmung, die signifikant ist. Es zeigte sich eher eine geringe Förderung des Wachstums von maximal 5,76 %. Im gleichen Testansatz wurde auch hier eine 17β -Östrogen-Positiv-Kontrolle mitgeführt. Das 17β -Estradiol zeigte in der Konzentration von $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$ eine geringfügige nicht signifikante Proliferationsförderung um maximal 1,86 %, in der Konzentration von $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$ eine leichte, nicht signifikante Hemmung der Proliferation um 1,73 % (siehe Abb. 3.22).

Zusammenfassung der Ergebnisse im BrdU-Test

Zusammenfassend lässt sich also zu beiden durchgeführten BrdU-Tests sagen, dass sich bei gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt im Vergleich zur Tamoxifenkontrolle in beiden Tests eine stärkere proliferationshemmende Wirkung zeigt. Die gemeinsame Gabe der beiden Substanzen zeigt gegenüber der Leinwurzelkontrolle im ersten Test vor allem in den höheren Konzentrationen eine stärkere Hemmung der Proliferation. Im zweiten BrdU-Test zeigt sich in allen Konzentrationen der Leinwurzel und gemeinsamer Gabe von Tamoxifen ein stärkerer proliferationshemmender Effekt gegenüber der Tamoxifen- und der jeweiligen Leinwurzelextraktkontrolle.

3.5 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie

In der durchgeführten Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie konnten die Hauptklassen der im Leinwurzelextrakt und in der Leinwurzel enthaltenen Substanzklassen bestimmt werden. In den Abbildungen 3.25 und 3.26 sind die mengenmäßig am häufigsten auftretenden Gruppen dargestellt.

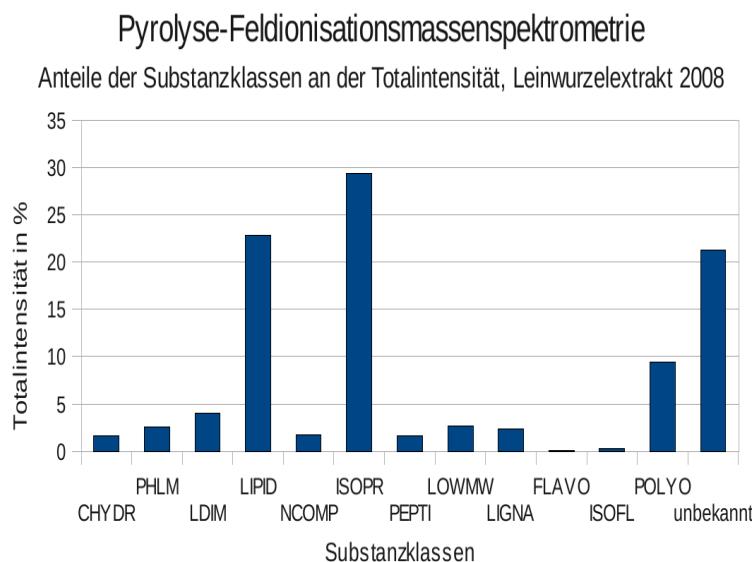


Abbildung 3.25: Graphische Darstellung der Anteile der Substanzklassen der Leinwurzelextrakte (Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie).

Kommentar zu Abbildungen 3.25 und 3.26: Tabellarische Auflistung der Anteile der Substanzklassen an der Totalintensität und Abkürzungsverzeichnis siehe Tabelle 3.1.

Bei der Auswertung der Massenspektrometrie wurden die einzelnen Inhaltsstoffe aufgrund der ähnlichen Markersignale zu Gruppen zusammengefasst. Die Totalionenintensität ist insgesamt vergleichsweise niedrig, da es sich um leicht flüchtige Substanzen handelt. Es wurde zum einen die Leinwurzel und zum anderen der Extrakt aus der Wurzel analysiert.

Es zeigte sich in der Auswertung, dass bei der Leinwurzel die größte Substanzklasse die Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette (LIPID) mit einem Anteil von 16,15 % darstellten (siehe Abb.3.26).

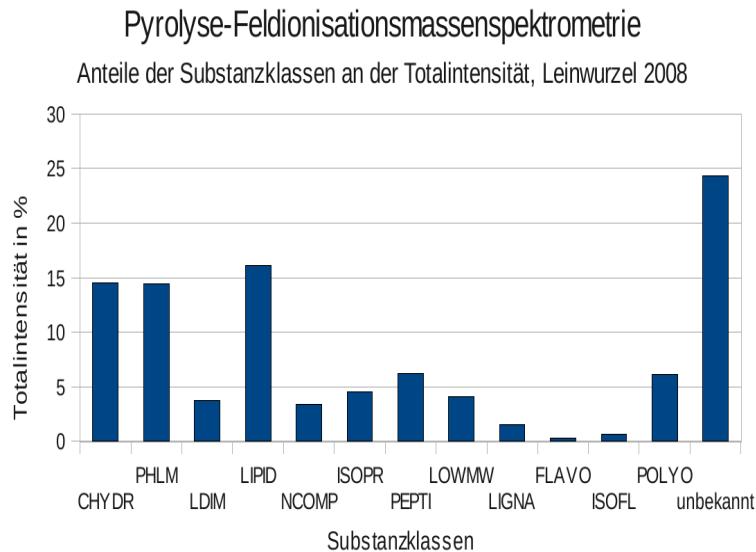


Abbildung 3.26: Graphische Darstellung der Anteile der Substanzklassen der Leinwurzel (Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie).

Ebenfalls anteilmäßig groß sind die Kohlenhydrate (CHYDR) mit 14,49 % und die Monolignole (PHLM) mit 14,5 %. Eine weitere stark vertretene Gruppe bilden die sonstigen Polyphenole mit einem Anteil von 6,10%. Weniger stark vertretene Gruppen sind die Lignindimere (LDIM), N-haltige Verbindungen (NCOMP), Lignane (LIGNA) Flavone (FLAVO) und die Isoflavone (ISOFL). Die Lignane bilden in der Leinwurzel einen Anteil von 1,5%.

Bei den nach Luengy et al. extrahierten Leinwurzeln bildeten die größte Gruppe die isoprenoiden Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide) (ISOPR) mit einem Anteil von 29,36%. Die zweitstärkste Gruppe sind die Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette (LIPID). Eine weitere stark vertretene Gruppe wie bei der reinen Wurzel sind die sonstigen Polyphenole mit einem Anteil von 9,5 %. Weniger stark vertretene Substanzklassen sind die Lignane, Flavone und Isoflavone, die ebenfalls zu den Polyphenolen zählen. Im Gegensatz zur reinen Wurzel sind die Kohlenhydrate und Monolignole ebenfalls weniger stark vertreten.

Im Vergleich ist also bei der reinen Leinwurzel die Gruppe der Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette am stärksten vertreten, die im Gegensatz zum Extrakt mit den kleinsten Anteil dort bilden. Dafür zeigt sich im Leinwurzelextrakt ein Ligananteil von 2,4 %.

Bei dem Extrakt bilden die größte Gruppe die isoprenoiden Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide), die bei der reinen Wurzel eher einen kleinen Anteil ausmachen.

Es bleibt bei der Auswertung ein nicht unerheblicher Teil nicht erkannt beziehungsweise nicht ausgewertet, das heißt es können noch viele Stoffe enthalten sein, die die Wirkung der Leinwurzel auf die Zellen ebenfalls beeinflussen können.

Tabelle 3.1: Tabellarische Auflistung der Anteile der Substanzklassen an der Totalintensität und Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Substanzklassen | Wurzel | Extrakt |
|-----------|---|---------|---------|
| CHYDR | Kohlenhydrate | 14,5 % | 1,60 % |
| PHLM | Monolignole | 14,5 % | 2,60 % |
| LDIM | Lignindimere | 3,70 % | 4,00 % |
| LIPID | Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, Wachse, Fette | 16,20 % | 22,80 % |
| NCOMP | N-haltige Verbindungen | 3,40 % | 1,80 % |
| ISOPR | Isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide) | 4,50 % | 29,40 % |
| PEPTI | Peptide und freie Aminosäuren | 6,20 % | 1,60 % |
| LOWMW | niedermolekulare Verbindungen % m/z 15 bis 56 | 4,10 % | 2,70% |
| LIGNA | Lignane | 1,50% | 2,40 % |
| FLAVO | Flavone | 0,30 % | 0,10 % |
| ISOFL | Isoflavone | 0,60 % | 0,30% |
| POLYO | sonstige Polyphenole (Suberin, Cutin, Stilbene, Tannine usw.) | 6,10% | 9,50% |

3.6 Immunhistochemie

Es werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Hormonrezeptoren der Zellen dargestellt. In dieser immunhistochemischen Untersuchung sind die MCF7-Zellen untersucht worden. Es wurden die Östrogenrezeptoren α und β sowie der Progesteronrezeptor bestimmt. Diese Hormone wurden zu den Zellen gegeben und anschließend ein definierter Antikörper hinzugefügt. Dann erfolgte durch Zugabe von Farbstoff eine Farbreaktion und die Bindung zwischen den Zellen und dem Hormon wurde somit sichtbar gemacht. Somit konnte ein positiver Hormonrezeptorstatus sichtbar gemacht werden. Es wurden bei den in dieser Arbeit verwendeten MCF7-Zellen sowohl die Östrogen- als auch die Progesteronrezeptoren nachgewiesen (siehe Abb. 3.27, 3.28, 3.29, 3.30).

Kommentar zu den Abbildungen 3.27, 3.28, 3.29 und 3.30: Nachweis der Rezeptoren auf den Zellen, bei positivem Nachweis erfolgt eine Rotfärbung.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen Effekte der Zellen, die durch den Extrakt der Leinpflanze hervorgerufen werden. Die Leinpflanze wurde im Jahr 2008 im Freiland der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock auf dem Campus der Albert-Einstein-Straße gezogen.

In der Immunhistochemie der MCF-7-Zellen lassen sich sowohl die Östrogenrezeptoren α und β , als auch der Progesteronrezeptor nachweisen.

In der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie bilden die isoprenoiden Verbindungen mit einem Anteil von 29, 36 % im Leinwurzelextrakt den größten Anteil . Die Lignane bilden einen Anteil von 2,4 %.

In den Zytotoxizitäts- als auch in den Proliferationstests ist überwiegend eine dosis-abhängige Wirkung der Leinwurzelextrakte auf die Mammakarzinomzellen zu erkennen. Eine direkte Korrelation von Dosis und Wirkung ist anzunehmen.

In den LDH-Tests zeigte sich eine zytotoxische Wirkung der Leinwurzel allein, aber auch zusammen mit Tamoxifen vorwiegend in den höheren Konzentrationen der Leinpflanze. In diesem Test variieren die Ergebnisse. Überwiegend ist ein verstärkender zytotoxischer Effekt bei gemeinsamer Gabe gegenüber der alleinigen Gabe der Leinwurzel zu erkennen, während man keine eindeutigen Aussagen zu einer verstärkenden oder vermindernden zytotoxischen Wirkung bei gemeinsamer Gabe der Substanzen gegenüber der alleinigen Gabe von Tamoxifen machen kann.

Im MTT-Test zeigt sich eine Wachstumshemmung vorwiegend bei der gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen, im Vergleich zur alleinigen Gabe des Leinwurzelextraktes. Gegenüber der alleinigen Tamoxifengabe zeigt sich eher einer Zunahme der Proliferation der Zellen.

Im BrdU-Test zeigt sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen der Leinwurzel, allein und mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen eine Hemmung der Proliferation, wobei hier das Tamoxifen bei alleiniger Gabe beim BrdU-Test nicht proliferationshemmend wirkt. Es lässt sich vor allem im BrdU-Test ein verstärkt hemmender Effekt im Vergleich zur alleinigen Tamoxifengabe und im Vergleich zur alleinigen Leinwurzelextraktgabe feststellen.

In allen drei verschiedenen Tests zeigt sich zusammenfassend also ein verstärkender Effekt bei gemeinsamer Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen, im Vergleich zur alleinigen Leinwurzelgabe, der auch signifikant ist. Verglichen mit der alleinigen Tamoxifengabe sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Überwiegend ist jedoch auch hier von einem verstärkt hemmenden Effekt auszugehen.

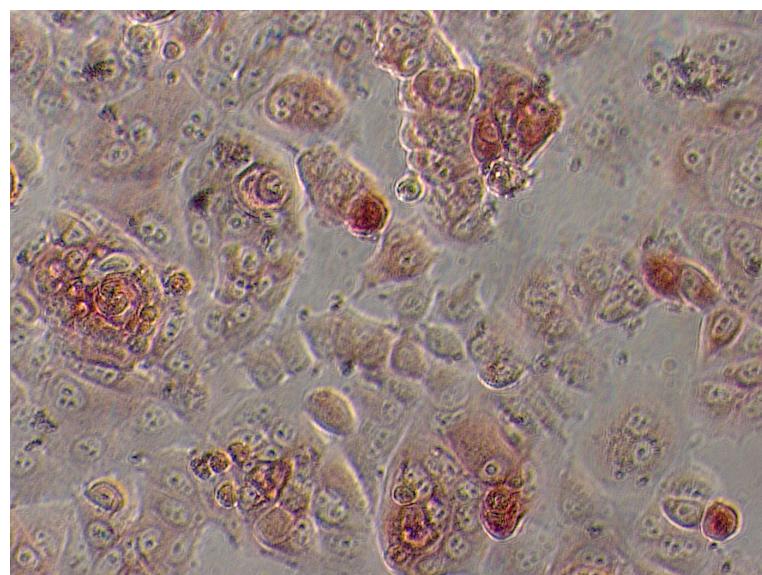


Abbildung 3.27: ER α , MCF-7-Zellen.

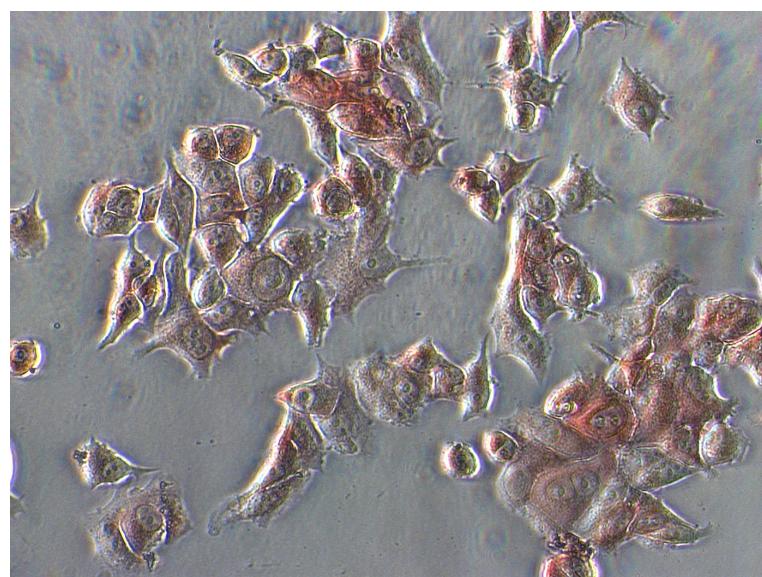


Abbildung 3.28: ER β , MCF-7-Zellen.

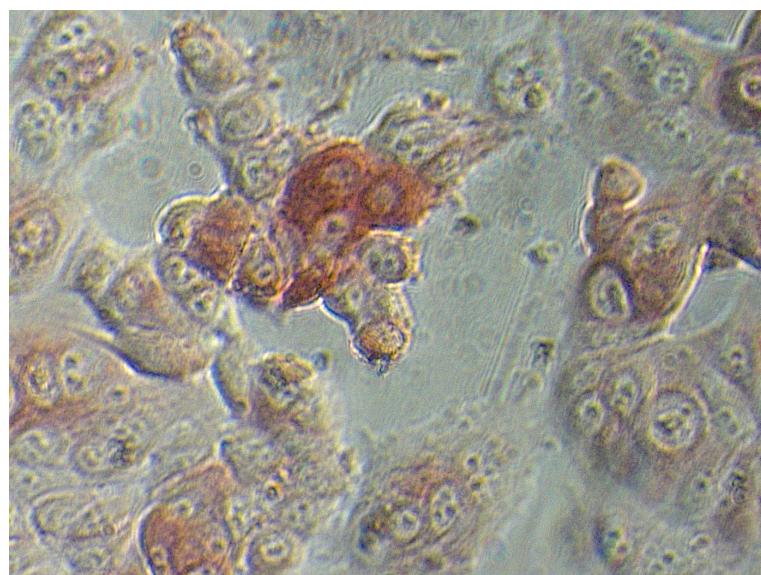


Abbildung 3.29: Progesteronrezeptor, MCF-7-Zellen.

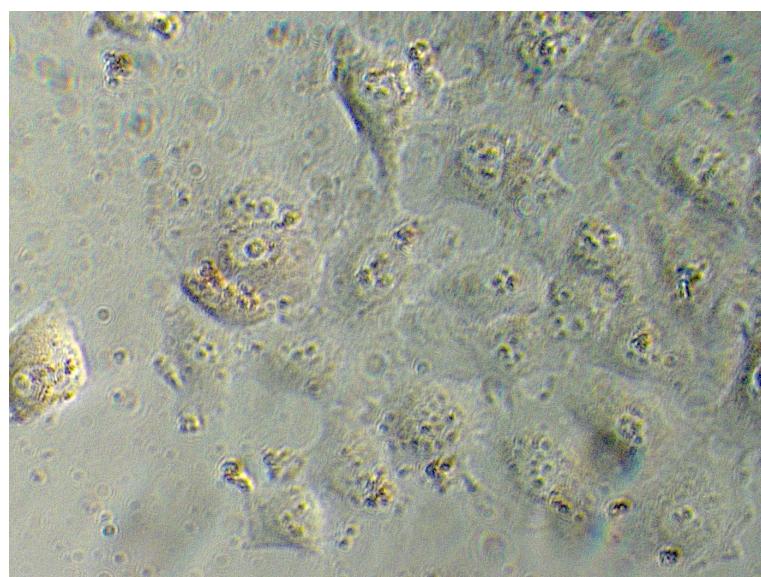


Abbildung 3.30: Negativkontrolle ohne Antikörperzugabe, MCF-7-Zellen.

Kapitel 4

Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse meiner Arbeit interpretiert. Ein Vergleich mit der Literatur erfolgt ebenfalls. In der Literatur über die Leinpflanze variieren die Angaben jedoch sehr stark. Insgesamt lässt sich sagen, dass es durchaus wichtig war, die Wirkung von Leinwurzelextrakten und Tamoxifen zusammen auf Mammakarzinomzellen zu untersuchen und zu zeigen, ob Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen alleinigen Gabe bestehen. Es stellten sich Unterschiede heraus, die abhängig vom jeweiligen Testverfahren variieren. Der LDH-Test untersucht die Zytotoxizität der verschiedenen Substanzen. Dies spiegelt die Letalität der Zellen wider. Der MTT-Test misst die Mitochondrien-Aktivität der Zellen. Es können dadurch Aussagen über die Vitalität der Zellen gemacht werden. Der BrdU-Test zeigt die Menge an proliferierenden Zellen an.

4.1 LDH-Test

Es konnte im LDH-Test mit den Leinwurzelextrakten ein zytotoxischer Effekt auf die Mammakarzinomzellen gesehen werden. In den verschiedenen Versuchen war auch überwiegend eine Dosis-Wirkungsbeziehung sichtbar, das heißt, höhere Dosen des Leinwurzelextraktes zeigten auch eine höhere zytotoxische Aktivität.

Bei der alleinigen Gabe der Leinwurzelextrakte zeigte sich vor allem in den Konzentrationen 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 125 µg/ml und 250 µg/ml ein wachstumshemmender Effekt, der auch signifikant ist. Die Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen zusammen zeigt in überwiegend allen Konzentrationen in allen LDH-Versuchen einen hemmenden Effekt.

In den Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock, unter anderem in der Arbeit von N. Strater 2011, konnte die zytotoxische Wirkung der Leinwurzel auf die MCF-7-Zellen im LDH-Test gezeigt werden. Hier zeigte sich vor allem in den Konzentrationen 500 µg/ml und 1000 µg/ml eine deutliche zytotoxische Wirkung von maximal 55 % [78].

In meiner Arbeit zeigt sich ein maximaler zytotoxischer Effekt bei der alleinigen Gabe der Leinwurzel (in einer Konzentration von 250 µg/ml) von 48,96 %, das heißt, es sterben in vitro circa 49 % der vorhandenen MCF-7-Zellen ab. In einer Arbeit von M. Szewczyk 2007 zeigt sich bei den Konzentrationen der Leinwurzel im LDH-Test von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml die höchste Zytotoxizität, die jedoch nicht signifikant ist [81]. In der Arbeit von K. Theil 2011 zeigt sich eine Zytotoxizität von jeweils circa 80 % in den beiden höchsten Konzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml. In der Arbeit waren bei 50 µg/ml

und 100 µg/ml die zytotoxischen Effekte deutlich niedriger [82].

Ein möglicher Grund für diese Unterschiede sind die jeweils wahrscheinlich unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Pflanze. Die für meine Arbeit verwendete Leinpflanze stammt aus dem Jahr 2008. Die Pflanzen in den erwähnten Vorarbeiten stammen unter anderem aus den Jahren 2004, 2005 und 2007 [81] [78] [82]. Dies könnte zumindest teilweise die heterogenen Ergebnisse in den Tests erklären.

Auch Booth et al. 2006 konnte in Extrakten des Rotkleepfles jahreszeitliche Schwankungen der Inhaltsstoffe im Rotklee erkennen. Es gibt wenige Informationen über die beste Zeit der Rotkleeernte zur Maximierung des Gehaltes an Isoflavonen [31]. Hier wären weitere Studien zum Anbau der Leinpflanze nötig, um den optimalen Gehalt an antikanzerogenen Wirkstoffen zu ermitteln.

Aktuell erfolgen Untersuchungen zu den Wachstumsbedingungen der Pflanze im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock. N. Strater untersuchte die Leinpflanze unter Freilandbedingungen, während aktuell eine weitere Arbeit zu Wachstumsbedingungen im Gewächshaus durchgeführt wird [78].

Jedoch ist insgesamt die Tendenz zu erkennen, dass in höheren Konzentrationen der Leinwurzel eine zytotoxische Wirkung erfolgt, während sich in den niedrigen Konzentrationen eher kein oder ein geringer Effekt auf die MCF-7-Zellen zeigt.

Die Untersuchungen anderer Forschungslabore erfolgten vor allem an anderen Bestandteilen der Leinpflanze, insbesondere an Leinsamen und Leinöl. Saarinen et al. 2006 konnte unter anderem zeigen, dass Leinsamen einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen (MCF-7) haben [71]. In einer weiteren Arbeit von Truan et al. 2010 konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Leinsamenöl das Wachstum von menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) reduziert [83].

Die Gabe von Leinwurzel und Tamoxifen zusammen zeigt in fast allen Konzentrationen der Leinwurzel in den LDH-Versuchen einen zytotoxischen Effekt. Dies erklärt sich natürlich durch die zusätzliche Gabe von Tamoxifen selbst, welches ja bekanntermaßen zytotoxisch wirkt. In dieser Arbeit zeigt sich eine zytotoxische Wirkung des Tamoxifens in allen Versuchen von durchschnittlich 31 %, wobei es zu Abweichungen der Tamoxifentytotoxizität in den einzelnen Versuchen kommt, worauf in Abschnitt 4.4.2. noch eingegangen wird. Tamoxifen wird auch als Antiöstrogen bezeichnet und blockiert in vivo die Östrogenrezeptoren und wirkt teilweise agonistisch und antagonistisch und wird deshalb auch als SERM bezeichnet[64].

Auch hierzu existieren derzeit in der Literatur nur Arbeiten, die mit Leinsamen und Leinöl durchgeführt wurden. In einer Arbeit von Chen et. al. 2011 wurden die Wirkungen von Leinsamen und Leinöl auf die Gesundheit der Knochen von Brust-Tumor-tragenden Mäusen untersucht, die mit oder ohne Tamoxifen behandelt wurden. Es ist bekannt, dass sich bisher unter Tamoxifen ein positiver Effekt auf die Höhe des Knochenmineralgehaltes gezeigt hatte. Chen et al. untersuchte die Auswirkungen der Leinsamen oder des Leinöls, allein oder in Kombination mit Tamoxifen auf die Knochenfestigkeit bei ovarektomierten Mäusen mit menschlichen Brusttumoren (MCF-7). Leinsamen und Leinöl zeigten insgesamt keinen deutlichen Effekt auf die biomechanische Festigkeit der Knochen. Schlussfolgernd stellte sich hier aber heraus, dass Leinsamen und Leinöl die positiven Effekte des Tamoxifens auf den Knochen nicht verhindern [41]. Eine gemeinsame Gabe wäre also hier möglich.

Eine weitere Arbeit von Chen et al. 2011 zeigte die Wirkung von Leinsamen und Tamoxifen zusammen in Mäusen mit einem MCF-7-positiven Mammakarzinom [40]. Die Untersuchungen der Tumore erfolgten dann durch Immunhistochemie und es wurden die Zell-Proliferation, die Apoptose, die Expression von Östrogen-Genprodukten und die Signalwege erforscht. Es zeigte

sich eine Herunterregulierung der Expression von Östrogen-Genprodukten und Signaltransduktionswegen [55]. Das Ergebnis zeigte, dass Leinsamen das Tumorwachstum reduzieren und sogar den Effekt der Tamoxifen-Behandlung von menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) in Mäusen erhöhen. Die Tumor-Regression war in der gemeinsamen Gabe von Leinsamen und Tamoxifen größer als im Vergleich zur alleinigen Tamoxifen-Gabe [40]. In einer weiteren Arbeit von Saggar et al. 2010 bestätigte sich ebenfalls, dass Leinsamen und Leinöl die Wirkung von Tamoxifen bei der Hemmung des Tumorwachstums (MCF-7-positive Mammakarzinomzellen) verstärken. Die Mechanismen sind auch hier die ER-und Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwege. Besonders unter der Gabe des Leinöls zeigte sich eine Steigerung der Apoptoserate [73]. In einer weiteren Arbeit von Chen et al. 2007 wurde untersucht, ob der Effekt der Leinsamen, allein oder in Kombination mit Tamoxifen, dosisabhängig ist. Die Studie erfolgte auch hier an Mäusen. Leinsamen hemmten das MCF-7-Tumorwachstum dosisabhängig und erhöhten die inhibitorische Wirkung von Tamoxifen. Die gemeinsame Gabe von Tamoxifen und Leinsamen erhöhte auch hier die Wachstumshemmung der Tumorzellen [39].

In meiner Arbeit zeigt sich tendenziell in fast allen Konzentrationen der Leinwurzel allein und zusammen gegeben ein signifikanter Unterschied zur Tamoxifenkontrolle. Die Zytotoxizität fällt bei gemeinsamer Gabe insgesamt geringer aus als bei der Tamoxifengabe allein. Der direkte Vergleich der alleinigen Leinwurzelgabe mit der gemeinsamen Gabe von Tamoxifen zeigt, dass die Gabe der Substanzen zusammen einen stärkeren zytotoxischen Effekt hat.

Dies lässt schon insgesamt die Vermutung zu, dass die Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen zusammen weniger zytotoxisch wirkt als die alleinige Gabe von Tamoxifen im LDH-Versuch. Jedoch ist ein stärkerer Effekt bei gemeinsamer Gabe als bei der alleinigen Leinwurzelgabe zu erkennen.

4.2 MTT-Test

Im MTT-Test zeigen sich signifikante Verminderungen der Zellproliferation vor allem bei der gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen.

Die höchste Vitalitätsminderung erreicht die Gabe der Leinwurzelkonzentration zusammen mit Tamoxifen um 52,13 %. Bei der alleinigen Gabe von Leinwurzel zeigt sich immerhin eine Verminderung der Vitalität vor allem in den höheren Leinwurzelkonzentrationen (250 µg/ml und 500 µg/ml) um 15 beziehungsweise 44,5 %. Interessant ist, dass es in der alleinigen Gabe der Leinwurzel ohne gleichzeitige Gabe von Tamoxifenextrakt eher zu einer auch signifikanten Proliferationsförderung kommt (vor allem in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml und 100 µg/ml). Dies bestätigt sich aber auch in anderen Arbeiten (unter anderem von N. Strater). Hier zeigte sich allerdings auch bei den hohen Konzentrationen der Leinwurzel (auch 500 µg/ml und 1000 µg/ml) eine nur geringe Vitalitätsminderung [78]. In der Arbeit von M. Szewczyk bestätigt sich dies ebenfalls, es zeigten sich keine wesentlichen Effekte in den Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 100 µg/ml. Im Gegensatz dazu kam es hier in den höheren Konzentrationen (von 500 µg/ml und 1000 µg/ml) zu einer deutlicheren Hemmung der Proliferation, vergleichbar mit den Ergebnissen meiner Arbeit [81]. In der Arbeit von K. Theil bestätigten sich diese Ergebnisse ebenfalls [82].

Das Tamoxifen zeigt eine Hemmung des Wachstums im ersten MTT-Test um 36,35 %, während sich diese Hemmung im zweiten MTT-Test nicht bestätigt. In den bereits genannten Vorarbeiten bestätigt sich eine starke toxische Wirkung des Tamoxifens auf die MCF-7-

Zelllinie, vor allem in den höheren Konzentrationen des Tamoxifens [81] [78] [82].

Die Leinwurzelextrakte ohne Tamoxifengabe unterscheiden sich alle signifikant von der Tamoxifengabe und zeigen eher eine Proliferationsförderung an. Bei Gabe von beiden Substanzen zusammen kann man vermuten, dass hier vorwiegend das Tamoxifen allein wirkt und die Leinwurzelextrakte eher keinen Einfluss auf die Vitalitätshemmung haben. Vergleicht man nun die alleinige Gabe von Leinwurzel mit der gemeinsamen Gabe der beiden Substanzen, so zeigt sich in allen Leinwurzelkonzentrationen ein signifikanter Unterschied. Dies bestätigt die vermutlich vorwiegend alleinige Wirkung des Tamoxifens. Die Extrakte zusammen mit dem Tamoxifen zeigen sogar eine höhere Vitalität als das Tamoxifen allein an.

Zusammenfassend lässt sich beim MTT-Test also vermuten, dass die Leinwurzel die Wirkung des Tamoxifens sogar abschwächt.

In den im oberen Abschnitt bereits beschriebenen Arbeiten, unter anderem von Chen et al., wurde an Leinsamen und Leinöl geforscht. In den Versuchen, vorwiegend *in vivo* an Mäusen, bestätigte sich eine verstärkende Wirkung des Tamoxifens bei gleichzeitiger Gabe des Leins [55] [41] [40] [39].

Dies entspricht nicht unseren Schlussfolgerungen aus den LDH- und MTT-Tests. Nun muss man aber zum einen feststellen, dass *in vitro* und *in vivo*-Ergebnisse häufig nicht vereinbar sind aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Zum anderen wurden hier der Leinsamen und das Leinöl untersucht. Diese Bestandteile des Leins enthalten nicht zwangsläufig dieselben Substanzen, die für die antikanzerogene Wirkung zuständig sind. Es ist schon allein an der Untersuchung der verschiedenen Leinpflanzenbestandteile mittels Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie ersichtlich, dass die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe sehr unterschiedlich ist (M. Szewczyk) [81]. Dazu kommen unterschiedliche Wachstumsbedingungen der Pflanze.

In einer Arbeit von Du. M. Yang et al. 2012 wurde die Wirkung von Genistein bei gleichzeitiger Tamoxifengabe untersucht [88]. Das pflanzliche Östrogen (Phytoöstrogen) Genistein bindet selektiv an den ER β [64]. Genistein gehört zu den Isoflavonen und ist vor allem in Sojaprodukten enthalten [60]. Genistein hat hier sogar die hemmende Wirkung von Tamoxifen auf. Dies geschieht möglicherweise durch das Einwirken auf die Proliferation von Tumorzellen und auf die Apoptose. Aus dieser Studie geht hervor, dass Vorsicht geboten ist in Bezug auf den Konsum von Genistein von Brustkrebs-Patientinnen während einer Tamoxifen-Therapie [88]. Dieses Ergebnis entspricht wiederum den Ergebnissen in unseren Tests.

Man müsste weitere *in vivo*-Versuche durchführen und dabei den in unserer Arbeit verwendeten Leinwurzelextrakt untersuchen. Es wäre interessant, ob sich die wie im LDH- und MTT-Versuch beschriebene Abschwächung der Wirkung bei gleichzeitiger Gabe der beiden Substanzen bestätigen würde.

4.3 BrdU-Test

Im BrdU-Test zeigen sich signifikante Proliferationsverminderungen vor allem in den höheren Konzentrationen (von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) der Leinwurzel allein und zusammen mit Tamoxifen. Dies bestätigt sich auch wieder in Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock (N. Strater, M. Szewczyk, K. Theil) [81] [78] [82].

Die Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zeigt jedoch keine Vitalitätshemmung im BrdU-Test, auch nicht bei der Gabe von Tamoxifen und Leinwurzel zusammen. Dies lässt eher einen Fehler in den Versuchsbedingungen vermuten. In allen anderen Tests ließ sich eine Dosis-

Wirkungsbeziehung zeigen, bis einschließlich 500 µg/ml Extrakt und in den Vorarbeiten zeigt sich dies in ähnlicher Weise [81] [78] [82]. Tamoxifen allein zeigt interessanterweise eher eine Proliferationszunahme, die jedoch nicht signifikant ist, also ist eher davon auszugehen, dass Tamoxifen im BrdU-Test hier keinen Einfluss auf die Zellen hat. In den oben genannten Arbeiten zeigt sich in den niedrigen Konzentrationen des Tamoxifens ebenfalls kein Effekt, während jedoch in den höheren Tamoxifenkonzentrationen eine deutliche Proliferationsminderung auftritt [81] [78] [82].

Eine Ursache hierfür, gerade auch im Vergleich zum MTT- und LDH-Test, könnte das Testprinzip sein. Tamoxifen wirkt durch kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind östrogenrezeptorpositiv. BrdU wird hier als Thymidin-Analogon in die neu synthetisierte DNA eingebaut [20]. Gerade im BrdU-Test verhält sich das Tamoxifen anders und zeigt hier überwiegend keine Wirkung. Es stellt sich also wieder die Frage, welche anderen Mechanismen durch den Leinwurzelextrakt aktiviert werden. Die Leinwurzel dagegen zeigt nämlich eine signifikante Proliferationshemmung. Vergleicht man nun wieder die Gabe der Leinwurzel und die Gabe der beiden Substanzen zusammen, so zeigt sich, dass im direkten Vergleich trotzdem Leinwurzel und Tamoxifen zusammen einen stärkeren proliferationshemmenden Effekt auf die MCF-7-Zellen haben, vor allem auch hier in den höheren Konzentrationen (von 1 µg/ml bis 250 µg/ml).

Sowohl der BrdU- als auch der MTT-Test nehmen jeweils Einfluss auf die Proliferation beziehungsweise Vitalität, das heißt, es sollten sich eigentlich ähnliche Ergebnisse zeigen. Dies ist beim Leinwurzelextrakt auch der Fall, nur beim Tamoxifen unterscheiden sie sich. Ursache kann auch der unterschiedliche experimentelle Ablauf sein. Auch äußere Umstände wie Luftfeuchtigkeit, Umgebungstemperatur und Zellpassage spielen eine Rolle bei den Ergebnissen der Tests. Weitere Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse, gerade beim Tamoxifen, werden in Abschnitt 4.4.2 aufgeführt.

In diesem Test lässt sich also vermuten, dass die Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen zusammen einen stärkeren hemmenden Effekt auf die Vitalität der MCF-7-Zellen zeigt als die jeweils alleinige Gabe der Substanzen. Den Wirkmechanismus dieser Phänomene kann man noch nicht genau erklären. Dies bestätigt sich in der Literatur in Arbeiten, die vor allem die Wirkung von Leinsamen und Leinöl untersucht haben (unter anderem von Chen et al.). Hier zeigte sich, wie bereits im Abschnitt 4.1. beschrieben, dass Leinsamen das Tumorwachstum reduzieren und sogar den Effekt der Tamoxifen-Behandlung von menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) in Mäusen erhöhen können [40].

Es ist davon auszugehen, dass nicht nur eine ausschließlich vermittelte Wirkung über den Östrogenrezeptor existiert. Es kommen vermutlich noch weitere Mechanismen in Frage. Es gibt noch eine ganze Reihe hormonunabhängiger Wirkungen von Phytoöstrogenen. Unter anderem induzieren sie die Apoptose, hemmen die DNA-Topoisomerase II sowie verschiedene Proteintyrosinkinasen und aktivieren PPAR [60] [24].

Es kann laut einer Arbeit von Hostenska et al. 2004 auch zu einer Verringerung der Zellproliferation und Zunahme der Apoptose unabhängig vom Hormonrezeptorstatus der Mammarkarzinomzellen kommen [54].

Wie bereits beschrieben wird das BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut [20]. BrdU (Bromodesoxyuridin) ist ein Thymidin-Analogon und wird im Test in die neu synthetisierte DNA eingebaut. BrdU selbst zeigt aber auch antiproliferative Wirkungen auf Krebszellen. Eine einzige, kurze In-vitro-Exposition gegenüber BrdU soll eine tiefgreifende und anhaltende Reduktion der Proliferationsrate von Krebszellen zur Folge haben. Die Zellen sterben nicht ab, sondern regulieren einige Seneszenz-assoziierte Proteine

hoch, die in der G1-Phase des Zellzyklus dann akkumulieren [63]. Seneszenz ist ein bei Pflanzen verwendeter Begriff und bedeutet, dass ein genetisch gesteuerter und energieabhängiger Alterungsprozess in Gang gesetzt wird. Unter anderem gehören zu den Seneszenz-assoziierten Proteinen hydrolytische Enzyme, die Proteine, Nukleinsäuren und Lipide abbauen [9]. Das Ergebnis zeigt, dass BrdU auch als Zusatztherapie gegen viele Krebsarten aufgrund seiner Wirkung als Regulator im Zellzyklus verwendet werden kann. Schlussfolgernd könnte man sagen, dass auch das BrdU selbst einen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen haben kann. In unseren Tests haben wir jedoch deshalb immer Kontrollen mitgeführt und diese dann jeweils vom eigentlichen Wert abgezogen (siehe Kapitel 2).

Zusammenfassend zeigt sich also im BrdU-Test eine eher verstärkende Wirkung der Hemmung der Proliferation im Vergleich zur alleinigen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen.

4.4 Wirkungen des Östradiols und des Tamoxifens auf die Zelllinien

4.4.1 Östradiol

17β -Östradiol wird hier in den Versuchen als Positivkontrolle eingesetzt. Bei dieser Substanz konnte in keinem der hier durchgeföhrten Proliferations-Tests (MTT und BrdU-Test) eine signifikante Stimulation nachgewiesen werden. In den durchgeföhrten LDH-Tests konnte teilweise sogar eine geringgradige Zytotoxizität nachgewiesen werden. 17β -Östradiol kann in geringen Mengen proliferationsfördernd und in hohen Mengen zytotoxisch wirken, das heißt, die hier verwendeten Konzentrationen reichen aus, um teilweise eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen [66]. Dies bestätigt sich in ähnlicher Art und Weise auch in den Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock [81] [78] [82].

4.4.2 Tamoxifen

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Tamoxifenkontrolle sind bereits in den oberen Abschnitten aufgeführt worden. Tamoxifen wirkt als Antiöstrogen und hemmt das Wachstum von Mammakarzinomzellen [57].

Im Verlauf meiner Arbeit stellte sich heraus, dass die Tamoxifenwerte im LDH-Test sehr unterschiedlich hoch ausfallen. Es wurde immer die gleiche Tamoxifenkonzentration verwendet und diese wurde auch nie bei der Durchführung der Versuche geändert.

Alle Tamoxifenwerte des LDH-Tests sind noch einmal in einem Diagramm dargestellt. Es handelt sich hierbei um mindestens 40 Einzelwerte, die zusammen als ein Balken mit Standardabweichung dargestellt sind. Dargestellt sind auch die Mittelwerte der Zytotoxizität des Tamoxifens in den einzelnen LDH-Versuchen mit Standardabweichung (siehe Abb. 4.1).

Kommentar zur Abbildung 4.1: Zytotoxischer Einfluss des Tamoxifens (in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) auf die Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zelldestruktion durch Triton. Dargestellt sind die Tamoxifenwerte der jeweiligen Tests mit Standardabweichung. Diese Werte wurden dann insgesamt zur Bildung eines gemeinsamen Mittelwertes herangezogen.

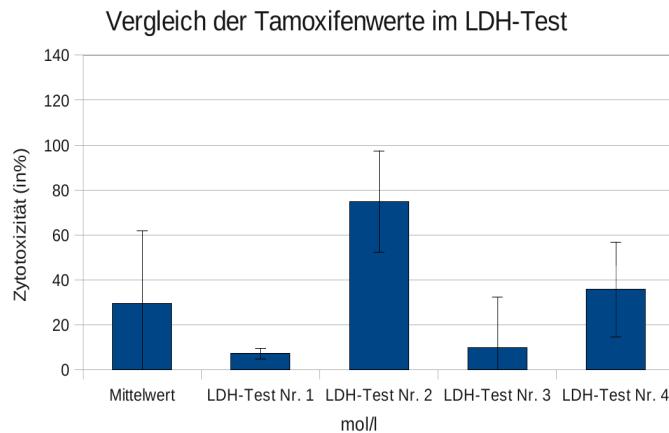


Abbildung 4.1: Tamoxifenvergleich im LDH-Test

Es ist deutlich eine sehr hohe Standardabweichung zu erkennen, wobei der Wert, der sich hier zeigt, aber dem eigentlichen Tamoxifenwert nahe kommen müsste. Warum fallen die Ergebnisse des Tamoxifens im LDH-Test so unterschiedlich aus? Mögliche Gründe hierfür könnten sein: Das Tamoxifen lässt sich als Pulver nicht gut lösen. Dadurch ist es möglich, dass in manchen Anteilen der Lösung deshalb eine hohe und in anderen eine niedrige Konzentration vorhanden war. Wir stellten die Tamoxifenlösung deshalb einige Stunden vor dem Versuch in den Brutschrank, damit sich das Tamoxifen im Ethanol besser lösen konnte. Eine Möglichkeit wäre hier zur Verbesserung eventuell eine vorherige Behandlung in einem Ultraschallbad und die längere Liegedauer des Tamoxifens vor dem Versuch im Brutschrank (eventuell mindestens 24 Stunden).

Zum anderen sind es Zellen, mit denen ich gearbeitet habe, das heißt jede Zelle reagiert in jedem Versuch anders und allein deshalb können unterschiedliche Werte entstehen. Außerdem sind die Zellpassagen nicht immer dieselben gewesen, was auch zu Unterschieden beigetragen haben könnte. Da die Werte vor allem in den LDH-Versuchen so unterschiedlich sind, liegt es vermutlich am Versuch selbst, das heißt, dass die Reagenzien unterschiedlich reagiert haben oder unterschiedliche Mengenzusammensetzungen gemacht worden sind. Bei den MTT und BrDU- Versuchen waren dagegen die Unterschiede der einzelnen Tamoxifenwerte deutlich geringer (siehe Abb. 4.2 und 4.3).

Kommentar zur Abbildung 4.2: Einfluss des Tamoxifens (in einer Konzentration von $1 * 10^{-5}$ mol/l) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF 7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). Dargestellt sind die Tamoxifenwerte der jeweiligen Tests mit Standardabweichung. Diese Werte wurden dann insgesamt zur Bildung eines gemeinsamen Mittelwertes herangezogen.

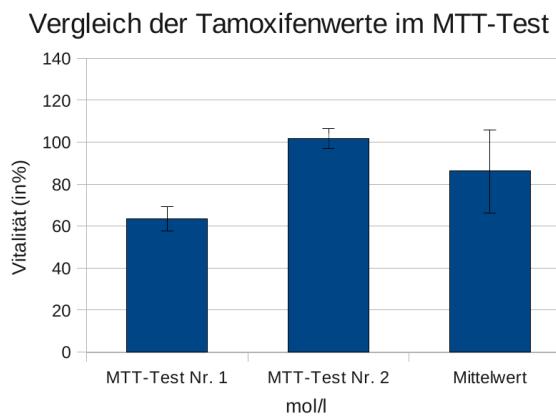


Abbildung 4.2: Tamoxifenvergleich im MTT-Test

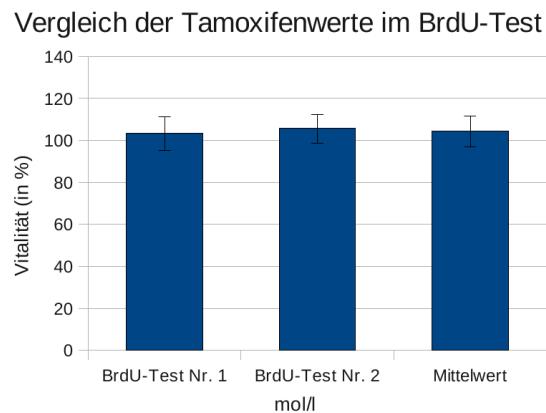


Abbildung 4.3: Tamoxifenvergleich im BrdU-Test

Kommentar zur Abbildung 4.3: Einfluss des Tamoxifens (in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, in Bezug zur 100 % gesetzten ethanolischen Negativkontrolle (Zellen und Ethanol). Dargestellt sind die Tamoxifenwerte der jeweiligen Tests mit Standardabweichung. Diese Werte wurden dann insgesamt zur Bildung eines gemeinsamen Mittelwertes herangezogen.

Letztendlich sind natürlich auch Pipetierfehler oder falsche Mengeneinstellungen als Ursache möglich.

Bei der Menge an Werten darf man davon ausgehen, dass der im Diagramm dargestellte Wert dennoch in etwa dem eigentlichen Tamoxifenwert entspricht. Letztendlich ist in den Versuchen eine Tendenz durchaus sichtbar und messbar, weshalb eine Auswertung und Schlussfolgerung dennoch möglich ist.

Zusätzlich wurden vor Beginn der eigentlichen Versuche Vorversuche zur Dosisfindung durchgeführt. Wir entschieden uns für die in dieser Arbeit verwendete Tamoxifenkonzentration, weil sich hier ein deutlich zytotoxischer Effekt gezeigt hatte. Außerdem ließen sich im Vergleich mit anderen Tamoxifenkontrollen aussagekräftigere Ergebnisse erzielen.

4.5 Interaktionen von Tamoxifen

In der Literatur sind einige Interaktionen im Zusammenhang mit Tamoxifen beschrieben. Es handelt sich vorwiegend um *in vivo* durchgeführte Versuche.

In einer Arbeit von Singh et al. 2012 zeigt sich, dass die relative Bioverfügbarkeit von Tamoxifen im Vergleich zur Kontrollgruppe sinkt, wenn die gleichzeitige Gabe von Biochanin A (ein Isoflavon) bei Ratten erfolgte [77].

Eine weitere Studie zeigte, dass das Risiko für Brustkrebs-Todesfälle bei Paroxetin-Exposition und gleichzeitiger Tamoxifen-Behandlung erhöht war. Paroxetin gehört zur Gruppe der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) [51] [9]. Tamoxifen muss im Körper durch ein weiteres Enzym in der Leber, Cytochrom-2D6 (CYP2D6), in eine wirksame Form umgewandelt werden. Das Antidepressivum Paroxetin blockiert dieses Enzym und verringert dadurch die Wirksamkeit von Tamoxifen [12].

In einer in einem oberen Abschnitt bereits beschriebenen Arbeit von Du. M. Yang et al. 2012 wurde die Wirkung von Genistein bei gleichzeitiger Tamoxifengabe untersucht [88]. Genistein hob hier sogar die hemmende Wirkung von Tamoxifen auf [88].

Auch Al-Azzawi et al. 2010 wies darauf hin, dass Phytoöstrogene nicht bedenkenlos eingesetzt werden sollten und gerade auch die gemeinsame Gabe mit Tamoxifen hinterfragt werden muss [25].

Aus der Shanghai Breast Cancer Survival Studie geht hervor, dass ein erhöhter Soja-Verzehr mit einem signifikant verringerten Risiko für Tod und Rezidiv eines Mammakarzinoms einherging und das sowohl bei gleichzeitiger Tamoxifeneinnahme als auch ohne [76].

In einer Arbeit von Suzuki et al. 2008 wurden MCF-7 Zellen mit Inhaltsstoffen von Gelée Royale (RJ) von Honigbienen (*Apis mellifera*) behandelt. Diese Bestandteile zeigen schwache östrogene Aktivität durch Interaktion mit Östrogen-Rezeptoren. Die erhöhte Proliferation wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit Tamoxifen blockiert [80].

Eine Studie von Sacco et al. 2007 ermittelte die interaktiven Effekte von lignanreichem Sesam und Tamoxifen auf das Tumorwachstum östrogenpositiver MCF-7-Mammakarzinomzellen und die Gesundheit der Knochen bei Mäusen. Sesam hemmte im Ergebnis nicht das MCF-7-Tumorwachstum und es zeigte sich sogar, dass die Tumor-hemmende Wirkung von Tamoxifen durch Sesam aufgrund der Erhöhung der Zellproliferation und einer reduzierten Apoptose aufgehoben wurde. Auf den Knochenstoffwechsel zeigten sich in dieser Studie bei gemeinsamer Gabe der beiden Substanzen jedoch positive Effekte [72].

In einer Arbeit von Chen et al. 2004 zeigte sich, dass Genistein und weitere Isoflavon-Analoga das Potential haben, die Wirkung von Tamoxifen durch die Verminderung des Hy-

droxytamoxifens zu beeinflussen. Dies geschieht durch die Hemmung von CYP450 1A2, welches Tamoxifen zu Hydroxytamoxifen umwandelt. Hydroxytamoxifen ist der aktive Metabolit des Tamoxifens (siehe Abschnitt 1.2.5) [38].

Diese Beispiele zeigen, dass Tamoxifen durchaus Interaktionspotential hat. Dies kann sich positiv bei der Behandlung von hormonrezeptorpositiven Tumorzellen auswirken, aber es kann auch zu einer Abschwächung der Wirkung des Tamoxifens insgesamt kommen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit von weiteren Untersuchungen zum Interaktionspotential des Tamoxifens. In vivo-Studien zur gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.6 Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie

Sowohl der Zytotoxizitätstest (LDH-Test) als auch der Proliferations- (BrdU-Test) und der Vitalitätstest (MTT-Test) zeigen antikanzerogene Effekte der Leinwurzel. Die wachstums-hemmende Wirkung zeigt sich besonders deutlich im BrdU-Test (siehe Abb.3.19 bis 3.24).

Wir nutzten die massenspektrometrische Analyse, um die Inhaltsstoffe der Leinwurzel zu ermitteln. Es wurde zum einen die Leinwurzel und zum anderen der in den Versuchen verwendete Leinwurzelextrakt untersucht.

In der Leinwurzel sind die mengenmäßig am größten vertretenen Substanzklassen die Kohlenhydrate und Monolignole. Diese kommen dagegen in dem Extrakt zu einem geringeren Anteil vor. In dem Extrakt sind dagegen die isoprenoiden Verbindungen und die Fette am umfangreichsten vertreten. Die isoprenoiden Verbindungen kommen in der Leinwurzel zu einem wesentlich geringeren Anteil vor, während die Fette auch in der Wurzel anteilmäßig groß sind (siehe Abb.3.25 und 3.26).

Mögliche antikanzerogene Substanzen sind die Lignane, welche Vorstufen von Ligninmono- und -dimeren sind. Die Lignane zeigen sich im Extrakt mit einem fast doppelt so großen Anteil wie in der Wurzel allein. Die Ligninmonomere sind im Extrakt ebenfalls anteilmäßig mit 4 % vertreten. Dies ist in der Leinwurzel ähnlich.

In einer Vorarbeit von N. Strater aus dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock hat sich bereits herausgestellt, dass die stärkste zytotoxische Wirkung bei dem Extrakt der alten Wurzel auftrat, in dem auch der höchste Anteil an Ligninmono- und -dimeren sowie Phenolen zu finden war [78]. Phytoöstrogene gehören zu den phenolischen Verbindungen. Dies spricht dafür, dass die antikanzerogene Wirkung durch Phytoöstrogene vermittelt wird. In der Arbeit von M. Szewczyk hat sich bereits herausgestellt, dass der größte Phytoöstrogenanteil in der Wurzel im Vergleich zu anderen Bestandteilen der Pflanze enthalten ist [81].

Eine weitere hemmende Wirkung auf die Zellproliferation wird durch die Fettsäuren vermittelt. Der Gehalt an Fettsäuren ist im Extrakt höher als in der Wurzel. Durch die Extraktion nach Luengy kommt es zum Ausschluss von Kohlenhydraten und Peptiden und zu einer Anreicherung von freien Fettsäuren und Sterolen in den Extrakten [81]. Fettsäuren aktivieren PPAR- γ (peroxisomal proliferator-activated receptor γ). PPAR sind Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels, in Entzündungsprozessen, im Zellwachstum und in der Differenzierung der Zellen spielen. An den PPAR- γ binden die Fettsäuren und Fettsäurederivate. Dadurch werden die PPAR- γ aktiviert und üben als Transkriptionsfaktoren einen starken Einfluss auf molekulare Vorgänge in normalen und Krebszellen aus. [86] [67].

Es zeigte sich auch bei anderen Krebsarten, zum Beispiel beim Krebs der Speiseröhre, eine Wachstumshemmung durch PPAR- γ -Liganden [70]. Von Carter und Church 2011 wurden Effekte der PAPR-Liganden auf die Zellbewegung und das Plasminogen-Aktivatoren-System gezeigt [37].

Die größte Gruppe bei den extrahierten Leinwurzeln bilden die Isoprenoiden Verbindungen (unter anderem die Sterole) mit einem Anteil von 29, 36 %. Die Sterole gehören zu den Steroiden. Sie sind auch in der Zellmembran enthalten. Das wichtigste Sterol ist das Cholesterin. Aus dem Cholesterin werden über viele Zwischenstufen die Östrogene gebildet (siehe Abschnitt 1.4) [64]. Es ist anzunehmen, dass die Sterole östrogene Aktivität besitzen.

Weitere hemmende Wirkungen auf die Mammakarzinomzellen haben die ebenfalls im Extrakt und in der Wurzel enthaltenen Flavone und Isoflavone.

In den durchgeführten Versuchen lassen sich, vor allem in den niedrigeren Konzentrationen des Leinwurzelextraktes, proliferationsfördernde Wirkungen nachweisen, wie zum Beispiel im BrdU-Test (siehe Abb. 3.19 und 3.22).

In den Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock zeigte sich, dass die Leinwurzel, die der kürzesten Wachstumsdauer ausgesetzt war, einen größeren Anteil von Sterolen enthielt. Diese Wurzel hatte auch den größten proliferationsfördernden Effekt auf die Krebszellen [78].

Auch die ölhaltige Komponente der Leinwurzel spielt eine Rolle bei der Krebsbehandlung. So wurden durch die Gabe von entfettetem Lein bei Ratten schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu einer Gabe von nicht entfettetem Lein erzielt [26].

Es lässt sich also insgesamt eine antikanzerogene Wirkung für folgende Stoffe festhalten: Polyphenole mit den Lignanen, Isoflavonen und Lignindimeren und für die Fettsäuren.

Es lohnt sich, in dieser Richtung noch weiter zu forschen, inwiefern weitere Stoffe für die antikanzerogene Wirkung der Leinwurzel verantwortlich gemacht werden können. Auch eine weitere Analyse der Untergruppen könnte Gegenstand einer Arbeit sein.

4.7 Weitere Einflüsse

In Tumogenesestudien zeigte sich eine Abhängigkeit der verschiedenen Tumorparameter (unter anderem Inzidenz und Größe) von der Zeit der Leingabe in Relation zur Karzinogenese. Die Leingabe während der Initiation hat einen größeren Effekt auf die Inzidenz als die Leingabe während der Promotion und Progression des Tumors. Dann zeigt sich insgesamt ein größerer Effekt auf die Tumorgröße. Hier wird also der präventive Effekt des Leins deutlich [26].

Bei der Entstehung eines Mammakarzinoms wird von einer Latenzzeit von wenigen Jahren bis zu mehreren Jahrzehnten ausgegangen. Das mittlere Erkrankungsalter für die Entstehung eines Mammakarzinoms liegt bei circa 62 Jahren [44]. Man kann demzufolge vermuten, dass die optimale Zeit für den Beginn der Gabe von Leinwurzelextrakt zur Prävention eines Mammakarzinoms um den Bereich der Menopause, das heißt in einem Alter der Patientinnen um 45 bis 55 Jahren liegt.

Auch, wie bereits erwähnt, spielen die Wachstumsbedingungen der Pflanze eine Rolle. Bei den bisher erwähnten Arbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock handelt es sich um Freiland-Pflanzen. In Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen können die jeweiligen Inhaltsstoffe im Lein variieren. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit

einer Standardisierung der Wachstumsbedingungen.

Eine weitere Arbeit wird aktuell im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik zu den Wachstumsbedingungen der Leinpflanze im Gewächshaus durchgeführt.

4.8 Ernährungsempfehlungen für den klinischen Alltag

Bei den vielen im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock durchgeführten Versuchen zur Leinpflanze und bei den Arbeiten, die in der Literatur zu finden sind, stellt sich letztendlich immer wieder die gleiche Frage: Was bedeuten die Ergebnisse für den klinischen Alltag?

Wenn man laut Versuchsbedingungen etwa die Menge an Wirkstoff für eine bestimmte Menge an Zellen berechnet, so kommt man in unseren Versuchen auf Konzentrationen von $0,01\mu\text{g}/\text{ml}$ bis $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Wirkstoff der Leinwurzelextrakte auf in etwa 5×10^5 Zellen pro Milliliter (siehe Kapitel 2). Daraus stellt sich zunächst die Frage, bei welchen Konzentrationen der Leinwurzel eine gute hemmende Wirkung auf die Mammakarzinomzellen in den durchgeführten Versuchen zu sehen war. In dieser Arbeit und in den Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock stellte sich heraus, dass eine Wirkung vor allem in den höheren Konzentrationen der Leinwurzel auftritt, das heißt in einem Bereich von $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ bis $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ [81] [82] [78]. Man müsste nun theoretisch in etwa abschätzen können, wieviele okkulte Krebszellen im menschlichen Organismus existieren. So ließe sich eventuell eine wirksame Dosis des Leinwurzelextraktes bestimmen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine Empfehlung in der Ernährung wäre auch die Häufigkeit der Einnahme von Leinwurzelextrakt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen einen Momentzustand der zytotoxischen beziehungsweise proliferationshemmenden Wirkung an. Hier wäre es wichtig, in weiteren Versuchen zu testen, ob es nach mehreren Tagen unter Leinwurzelzugabe zu einer Änderung der Wirkung auf die Mammakarzinomzellen kommt.

Insgesamt muss man jedoch auf die Notwendigkeit von in vivo-Studien verweisen, um die richtige tägliche Dosierung zu finden. In Arbeiten vor allem von Chen et al. wurde zum Beispiel die Wirkung von Leinsamen auf das Tumorwachstum von menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) untersucht [40].

Eine weitere Möglichkeit, um die richtige Dosis für eine Empfehlung für die Einnahme von Leinwurzelextrakt zu geben, wäre die Orientierung an den bereits auf dem Markt frei erhältlichen Phytoöstrogenen. Dazu gehören unter anderem das Flavonoid Chrysin. Von diesem werden etwa ein bis drei Gramm täglich empfohlen [10]. Ein weiteres bekanntes Flavonoid ist das Quercetin, das in einer Dosierung von 30 mg zweimal täglich verabreicht werden soll [11].

Gegenwärtig muss man aber zusammenfassen, dass die unkontrollierte Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln und von Leinwurzelextrakt über einen längeren Zeitraum hinweg noch nicht empfohlen werden kann. Die wissenschaftliche Datenlage zur Risikobewertung ist insgesamt unzureichend und uneinheitlich. Es fehlen weitere Studien, vor allem in vivo-Studien zur Gabe der richtigen Dosierung von Leinwurzelextrakt.

Derzeit können wir also keine konkreten Empfehlungen für eine Ernährung mit Leinwurzelextrakt geben.

4.8.1 Empfehlungen zur gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen

Letztendlich sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob die gemeinsame Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen möglich ist.

Aus den Versuchen in dieser Arbeit zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse. Abhängig vom Testverfahren zeigte sich entweder eine Verstärkung der Wirkung oder eine Abschwächung bei gemeinsamer Gabe der beiden Substanzen.

Auch die in der Literatur beschriebenen Arbeiten, vor allem zu Leinsamen und Leinöl, zeigen keine einheitlichen Ergebnisse. Jedoch ist vorwiegend eine verstärkende Wirkung beziehungsweise eine zumindest nicht abschwächende Wirkung bei gemeinsamer Gabe beschrieben worden.

Es lässt sich also vermuten, dass die gleichzeitige Gabe zur Rezidivprophylaxe eines Mammakarzinoms durchaus möglich ist. Jedoch fehlen hierzu, wie bereits beschrieben, die notwendigen weiteren Versuche, vor allem in vivo-Versuche und klinische Studien.

Demzufolge können wir derzeit auch hierzu derzeit keine konkreten Empfehlungen zur gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen geben.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das Interesse an alternativen Behandlungsmethoden hat in den letzten Jahren stetig zugenommen.

Auch diese Arbeit konnte ebenso wie die Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock bestätigen, dass die Leinwurzel ein großes Potenzial bei der Behandlung von hormonabhängigen Krebszellen hat. Auch eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nachgewiesen werden. In den hohen Konzentrationen zeigt sich ein hemmender Effekt auf die Zellen.

Es zeigten sich jedoch in dieser Arbeit uneinheitliche Ergebnisse, abhängig vom jeweiligen Testverfahren.

In den LDH-Tests zeigte sich eine hemmende Wirkung der Leinwurzel allein, aber auch zusammen mit Tamoxifen. Diese Hemmung zeigt sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen der Leinwurzel.

Im MTT-Test zeigt sich eine Wachstumshemmung vorwiegend bei der gemeinsamen Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen.

Im BrdU-Test zeigt sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen der Leinwurzel, allein und mit gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen eine Hemmung der Proliferation. Das Tamoxifen wirkt hier bei alleiniger Gabe im BrdU-Test nicht proliferationshemmend.

Vorwiegend im BrdU-Test lässt sich also eine verstärkende Wirkung bei gemeinsamer Gabe der beiden Substanzen vermuten.

In dieser Arbeit wurden die MCF-7-Zellen verwendet, welche hormonrezeptorpositiv sind. Mittels Immunhistochemie konnten die ER α und β sowie der Progesteronrezeptor nachgewiesen werden.

In der durchgeführten Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie zeigte sich, dass vermutlich die im Leinwurzelextrakt enthaltenen Polyphenole mit den Lignanen, Isoflavonen und Lignindimeren und Fettsäuren eine antikanzerogene Wirkung verursachen. Hier ist es notwendig, nach weiteren Inhaltsstoffen zu suchen beziehungsweise die einzelnen Substanzen zu isolieren und genauer zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, spielen auch die Wachstumsbedingungen der Pflanze eine Rolle.

In Tumogenesestudien zeigte sich eine Abhängigkeit der verschiedenen Tumorparameter von der Zeit der Leingabe in Relation zur Karzinogenese. Die Festlegung der Dauer der Leinwurzelgabe insgesamt und die Festlegung der zeitlich optimalen Einnahme könnten Gegenstand einer weiteren Arbeit sein.

Derzeit können keine konkreten Ernährungsempfehlungen zum Leinwurzelextrakt und

auch zur gemeinsamen Gabe von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt gegeben werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sowie Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock zur Leinpflanze haben vielversprechende Wirkung bei der Bekämpfung von Tumorzellen gezeigt.

Es handelt sich hierbei um in vitro-Studien und deshalb ist es notwendig, diese Wirkung auch in weiteren in vivo-Studien zu untersuchen.

Kapitel 6

Ausblick

Es sind insgesamt weitere Untersuchungen zu den einzelnen Wirkmechanismen der Inhaltsstoffe der Leinpflanze notwendig. Auch die einzelnen Substanzen müssen weiter analysiert werden.

Es lohnt sich außerdem, weitere Pflanzen aus der Umgebung zu untersuchen, die ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen haben. Im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock werden derzeit auch andere Pflanzen, wie zum Beispiel die Flatterulme untersucht und es zeigt sich in den ersten Ergebnissen auch hier eine Verminderung des Wachstums der Krebszellen [66].

Zur Leinwurzel wären unbedingt klinische Studien nötig, um die Anwendung im Alltag zu testen, da in vitro-Ergebnisse noch keine definitiven Aussagen über in vivo-Bedingungen machen können. Hier wäre auch die Suche nach der richtigen Dosierung der Leinwurzelextrakte notwendig. Es lässt sich in vivo auch die Wirkung von Tamoxifen und Leinwurzelextrakt zusammen untersuchen, was bereits unter anderem von Chen et al. an Mäusen mit dem Leinöl und den Leinsamen getestet worden ist [41]. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind vielversprechend für die Untersuchung von weiteren Bestandteilen der Leinpflanze.

Es wäre interessant, ob sich eine eher verstärkende Wirkung bei gemeinsamer Gabe von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen bestätigt.

Zur Zeit können zur Anwendung der Leinwurzel am Menschen diese Aussagen gemacht werden:

- Derzeit lassen sich die Leinwurzelextrakte noch nicht am Menschen zur Prävention von Krebserkrankungen anwenden.
- Es hat sich in den Arbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock gezeigt, dass vor allem die Leinwurzel im Vergleich zu den anderen Bestandteilen der Leinpflanze eine antikanzerogene Wirkung aufweist. In anderen Arbeiten haben sich das Leinöl und die Leinsamen als wirkungsvoll erwiesen.
- In Tumogenesestudien zeigte sich eine Abhängigkeit der verschiedenen Tumorparameter von der Zeit der Leingabe in Relation zur Karzinogenese. Es ist also wichtig, zu untersuchen, wann die optimale Zeit für die Gabe der Leinwurzel ist und wie lange eine Einnahme erfolgen sollte.
- Auch die Nebenwirkungen der Pflanze müssen beachtet werden und weitere Untersuchungen dazu sind notwendig.

- Mögliche Interaktionen der Leinwurzel und des Tamoxifens müssen in weiteren in vitro- und in vivo-Studien untersucht werden.
- Es müssen weitere Untersuchungen zum Metabolismus des Leinwurzelextraktes und des Tamoxifens erfolgen.
- Eine Ernährungsempfehlung kann nach derzeitigen Erkenntnissen noch nicht gegeben werden. Die wissenschaftliche Datenlage zur Risikobewertung ist insgesamt unzureichend und uneinheitlich.

Literaturverzeichnis

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Rotationsverdampfer.jpg>, Abruf: 13. März. 2012
- [2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Tamoxifen>, Abruf: 14. März. 2012
- [3] *Bürker-Zählkammer.* <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/buerker.html>, Abruf: 13. März. 2012
- [4] *Fachbereich Biowissenschaften der Universität Rostock*
- [5] *Hexal Leinpflanze.* <http://www.heilpflanzen-suchmaschine.de/lein/-leinbilder.shtml>, Abruf: 25. März. 2012
- [6] *Messverfahren für strömende Plasmen, Kapitel 5, Massenspektrometrie.* Institut für Raumfahrtsysteme
- [7] FROSTER (Hrsg.): *Metabolisierung von Tamoxifen.* <http://www.humangenetik-prof-froster.de/gendiagnostik/pharmakogenetikfuenf.html>, Abruf: 18. März. 2012
- [8] *Ortho Analytic AG.* <http://www.orthoanalytic.ch>, Abruf: 14. März. 2012
- [9] *Seneszenz.* <http://de.wikipedia.org/wiki/SeneszenzbeiPflanzen>, Abruf: 25. März. 2012
- [10] *Sportnahrung.de.* <http://sportnahrung.at/de/Chrysin>, Abruf: 18. März. 2012
- [11] *Vitalstoffjournal, Unabhängiger Informationsdienst für Naturheilkunde und orthomolekulare Medizin.* <http://www.vitalstoff-journal.de/shop/bioflavonoide/quercetin>, Abruf: 18. März. 2012
- [12] INFORMATIONSDIENST WISSENSCHAFT, Dr. Michael S. (Hrsg.): *Warnung vor Arzneimittel-Wechselwirkung bei Brustkrebs.* <http://idw-online.de/pages/de/news358250>, Abruf: 25. März. 2012
- [13] SCHMIDT CONSULTING UND TRADE (Hrsg.): *Die Welt der Trockenmittel.* <http://www.silikagel.de>, Abruf: 13. März. 2012
- [14] *Skript Massenspektrometrie zum Kurs Spektroskopische Methoden.* MS-Abt. am OCI, INF 27, 1999
- [15] *Roche Lexikon Medizin.* Urban und Fischer, 5. Auflage, 2003

- [16] GRANDMONT, Jean-Pol (Hrsg.): *Gemeiner Lein.* Version: 2005. <http://de.wikipedia.org/wiki/GemeinerLein.de>, Abruf: 25. März. 2012
- [17] *Instruction Manual LDH.* Roche Diagnostics GmbH, 2005
- [18] *Instruction Manual MTT.* Roche Diagnostics GmbH, 2005
- [19] *LGC Prochem.* Website der LGC Promochem Cell Biology Catalog, 2006
- [20] *Instruction Manual BrdU.* Roche Diagnostics GmbH, 2007
- [21] *statistsches Bundesamt.* 2009
- [22] ABARZUA, S. ; SERIKAWAAND, T. ; SZEWCZYK, M. ; RICHTER, D.-U. ; PIECHULLA, B. ; BRIESE, V.: Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. In: *Archives of gynecology and obstetrics* (2011)
- [23] ABARZUA, S. ; SZEWCZYK, M. ; GAILUS, S. ; RICHTER, D.-U. ; RUTH, W. ; BRIESE, V. ; PIECHULLA, B.: Effects of phytoestrogen extracts from Linum usitatissimum on the Jeg3 human trophoblast tumor cell line. In: *Anticancer Research (in press)* (2011)
- [24] ADLERCREUTZ, H. ; MAZUR, W.: Phytoestrogens and western diseases. In: *Ann. Med* (1997)
- [25] AL-AZZAWI, F. ; WAHAB, M.: Effectiveness of phytoestrogens in climacteric medicine. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* (2010)
- [26] ALISTER, M. D. ; WESTCOTT, Neil D.: Flax, The genus Linum, Routledge, Taylor and Francis Group, London, New York. (2004)
- [27] AMAN, U. ; BUZDA, M. D.: Tamoxifen's clinical application-old and new. In: *Arch Fam Med* (2000)
- [28] BALTZER, J. ; LÖNING, J. T. ; RIETHDORF, L. ; SINN, H. P. ; WAGNER, G.: Klassifikation maligner Tumoren der weiblichen Genitalorgane, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg. (2005)
- [29] BASCH, E. E.: Flax and Flaxseed Oil (Linum usitatissimum): A Review by the Natural Standard Research Collaboration. In: *Journal of the Society for Integrative Oncology, Decker-Verlag* (2007)
- [30] BERGMAN-JUNGESTRÖM, M. ; THOMPSON, L. U. ; DABROSIN, C.: Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2007)
- [31] BOOTH, N. L. ; OVERK, C. R. ; YAO, P. ; TOTURA, S. ; DENG, Y. ; HEDAYAT, A. S. ; BOLTON, J. L. ; PAULI, G. F. ; FARNSWORTH, N. R.: Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity. In: *Journal of agricultural and food chemistry* (2006)
- [32] BRADLOW, H. L. ; SEPКОVIC, D. W. ; TELANG, N. T. ; OSBORNE, M. P.: Indol-3-carbinol. A Novel approach to breast cancer prevention. In: *Ann NY Acad Sci 768* (1995)

- [33] BRIESE, Volker ; ABARZUA, Sibylle ; RICHTER, Dagmar-Ulrike ; PIECHULLA, Birgit ; NEBE, Barbara ; BARTOS, James R.: Molecular and Cell Biological Investigations of the Mode of Action of Established and Potential Phytoestrogens for the Development of Strategies in the Prevention and Treatment of Cancer. In: *Estrogenes: Production, Functions and Applications* (2009)
- [34] BUDZIKIEWICZ, H.: Massenspektrometrie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim. (1980)
- [35] BUDZIKIEWICZ, H. ; GRIGSBY, R.: Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion. (2006)
- [36] CARAGAY: cancer-preventive foods and ingredients, Food technology. (1992)
- [37] CHARTER, J. C. ; CHURCH, F. C.: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands Alter Breast Cancer Cell Motility through Modulation of the Plasminogen Activator System. In: *J Oncol.* (2011)
- [38] CHEN, J. ; HALLS, SC. ; ALFARO, JF. ; ZHOU, Z. ; HU, M.: Potential beneficial metabolic interactions between tamoxifen and isoflavones via cytochrome P450-mediated pathways in female rat liver microsomes. In: *Pharmaceutical research* (2004)
- [39] CHEN, J. ; POWER, KA. ; MANN, J. ; CHENG, A. ; THOMPSON, LU.: Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* (2007)
- [40] CHEN, J. ; SAGGAR, JK. ; COREY, P. ; THOMPSON, LU.: Flaxseed cotyledon fraction reduces tumour growth and sensitises tamoxifen treatment of human breast cancer xenograft (MCF-7) in athymic mice. In: *The British journal of nutrition* (2011)
- [41] CHEN, J. ; SAGGAR, JK. ; WARD, WE. ; THOMPSON, LU.: Effects of flaxseed lignan and oil on bone health of breast-tumor-bearing mice treated with or without tamoxifen. In: *Journal of toxicology and environmental health* (2011)
- [42] DAMBROTH, M. ; SEEHUBER, R.: Flachs-Züchtung, Anbau, Verarbeitung, Stuttgart. (1988)
- [43] DAVIS, D. L. ; BRADLOW, H. L.: Can environmental estrogens cause breast cancer? In: *Scientific American 10/95* (1995)
- [44] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR SENOLOGIE E.V., Deutsche K.: S3-Leitlinie, Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. (20.02.2008)
- [45] DIEPENBROCK, W.: Spezieller Pflanzenbau, Stuttgart. (1999)
- [46] DUNN, B. K. ; WICKERHAM, D. L. ; FORD, L. G.: Prevention of hormone-related cancers: breast cancer. In: *J Clin Oncol* (2005)
- [47] EMONS, G. ; GRÜNDKER, C. ; HANF, V.: Sind Estrogene Karzinogene? In: *Der Gynäkologe* (2003)
- [48] FROHNE, Dietrich: Heilpflanzen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. (2002)

- [49] GOLDHIRSCH, A. ; GLICK, J. H. ; GELBER, R. D.: Meeting highlights:International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. In: *Ann Oncol* 16 (2005)
- [50] H.-U-GRIMM: Leinöl macht glücklich. Das blaue Ernährungswunder. (2006)
- [51] HINES, L. E. ; MURPHY, J. E.: Potentially harmful drug-drug interactions in the elderly: a review. In: *The American journal of geriatric pharmacotherapy* (2011)
- [52] HÖFLER, H. ; M. SARBIA, M ; WERNER, M.: Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie, Allgemeine Onkogenese und Tumorpathologie, Springer-Verlag. (2006)
- [53] HORN, F.: Biochemie des Menschen, Thieme, 3. Auflage, Stuttgart, New York. (2005)
- [54] HOSTANSKA, K. ; NISSLIN, T. ; FREUDENSTEIN, J. ; REICHLING, J. ; SALLER, R.: Title: Cimicifuga racemosa extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. In: *Breast cancer research and treatment* (2004)
- [55] J.CHEN ; POWER, KA. ; MANN, J. ; CHENG, A. ; THOMPSON, LU.: Dietary flaxseed interaction with tamoxifen induced tumor regression in athymic mice with MCF-7 xenografts by downregulating the expression of estrogen related gene products and signal transduction pathways. In: *Nutrition and cancer* (2007)
- [56] KRAZEISEN, Antje: Einfluss von Phytoestrogenen auf die Aktivität der 17β -Hydroxysteroiddehydrogenasen, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit Institut für Experimentelle Genetik Neuherberg. (2001)
- [57] KREIENBERG, A. ; MÖBIUS, V. ; ALT, D.: Management des Mammakarzinoms, Ein Leitfaden für die Praxis, Springer-Verlag. (1998)
- [58] KREIENBERG, R. ; MÖBUS, V. ; JONAT, W. ; KÜHN, T.: Mammakarzinom Interdisziplinär, Epidemiologie, Springer-Verlag, 4. Auflage. (2010)
- [59] KREUTZIG, T.: Kurzlehrbuch Biochemie, Urban und Fischer, 10. Auflage, München, Jena. (2000)
- [60] KULLING, S. ; WATZL, B.: Phytoöstrogene. In: *Ernährungsumschau, Karlsruhe* (2003)
- [61] LAMARTINIÈRE, C. A. ; MOORE, J. ; HOLLAND, M. ; BARNES, S.: Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 208 (1995)
- [62] LEHRAIKI, Abdelali ; ATTOUMBRÉ, Jacques ; BIENAIMÉ, Christophe ; MATIFAT, Fabrice ; BENSADDEK, Lamine ; NAVA-SAUCEDO, Edmundo ; FLINIAUX, Marc-André ; OUADID-AHIDOUCH, Halima ; BALTORA-ROSSET, Sylvie: Extraction of lignans from flaxseed and evaluation of their biological effects on breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. In: *Journal of medicinal food* (2010)
- [63] LEVKOFF, Lindsay H. ; MARSHALL, Gregory P. ; ROSS, Heather H. ; CALDERIA, Maria ; REYNOLDS, Brent A. ; CAKIROGLU, Meryem ; MARIANI, Christopher L. ; STREIT, Wolfgang J. ; LAYWELL, Eric D.: Bromodeoxyuridine Inhibits Cancer Cell Proliferation In vitro and In vivo. In: *Neoplasia* (2008)

- [64] LÖFFLER ; PETRIDES: Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 7. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York. (2003)
- [65] MOSSA, B. ; MARZIANI, R. ; HANNUNA, R. ; IUELE, K. ; MELLUSO, T. ; NAPOLITANO, J.: Antiestrogenic therapy in breast cancer and endometrial modifications. In: *European journal of gynaecological oncology* (2005)
- [66] PASCHKE, Daniel: Beeinflussung des Proliferationsverhaltens hormonaktiver Mamma und Endometriumkarzinomzellen unter Einwirkung eines Pflanzenextraktes aus der Flatterulme *Ulmus laevis*, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universität Rostock. (2009)
- [67] POULSEN, L. I.C. ; SIERSBÆK, Majken ; MANDRUP, Susanne: PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. In: *Seminars in cell and developmental biology* (2012)
- [68] RAINÉ, S.-M. ; FANGER, L.-H.: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide ormones with radioimmunoassay antibodies. In: *Am-J-Clin-Pathol*
- [69] RICHTER, Gerhard: Biochemie der Pflanzen, Thieme Verlag, Stuttgart, New York. (1996)
- [70] RUMI, M. A. ; SATO, H. ; ISHIHARA, S. ; ORTEGA, C. ; KADOWAKI, Y. ; KINOSHITA, Y.: Growth inhibition of esophageal squamous carcinoma cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. In: *J Lab Clin Med* (2002)
- [71] SAARINEN, N. M. ; POWER, K. ; CHEN, J. ; THOMPSON, L. U.: Flaxseed attenuates the tumor growth stimulating effect of soy protein in ovariectomized athymic mice with MCF-7 human breast cancer xenografts. In: *Int J Cancer* (2006)
- [72] SACCO, SM. ; POWER, KA. ; CHEN, J. ; WARD, WE. ; THOMPSON, LU.: Interaction of sesame seed and tamoxifen on tumor growth and bone health in athymic mice. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* (2007)
- [73] SAGGAR, J. K. ; CHEN, J. ; COREY, P. ; THOMPSON, L. U.: Dietary flaxseed lignan or oil combined with tamoxifen treatment affects MCF-7 tumor growth through estrogen receptor- and growth factor-signaling pathways. In: *Molecular nutrition and food research* (2010)
- [74] SCHEPPLER, Claudia: Molekular-chemische Charakterisierung von transgenem und nicht transgenem Kartoffelknollenmaterial mittels massenspektrometrischer Verfahren, Universität Rostock, Institut für Chemie, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Steinbeis-Transferzentrum, Soil Biotechnology. (2008)
- [75] SCHLICHING, A.: *Steinbeis-Transferzentrum Soil Biotechnology*
- [76] SHU, XO. ; ZHENG, Y. ; CAI, H. ; GU, K. ; CHEN, Z. ; ZHENG, W. ; LU, W.: Soy food intake and breast cancer survival. In: *JAMA : the journal of the American Medical Association* (2009)
- [77] SINGH, S. P. ; WAHAJUDDIN, K. S. R. ; KOHLI, M. M. Ali K. ; JAIN, G. K.: Reduced bioavailability of tamoxifen and its metabolite 4-hydroxytamoxifen after oral administration with biochanin A (an isoflavone) in rats. In: *Phytotherapy research : PTR* (2012)

- [78] STRATER, Nicole: Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze Linum usitatissimum unterschiedlicher Altersstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien, Universitätsfrauenklinik Rostock. (2011)
- [79] STRYER, L.: Biochemie, Elsevier, 6. Auflage, München. (2007)
- [80] SUZUKI, KM. ; ISOHAMA, Y. ; MARUYAMA, H. ; YAMADA, Y. ; NARITA, Y. ; OHTA, S. ; ARAKI, Y. ; MIYATA, T. ; MISHIMA, S.: Estrogenic activities of Fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine* (2008)
- [81] SZEWCZYK, Marlen: Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze Linum usitatissimum auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humander Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten, Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt, Rostock. (2007)
- [82] THEIL, Konrad: Untersuchungen zum Einfluss eines Linum usitatissimum-Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17beta-Estradiol, Universitätsfrauenklinik Rostock. (2011)
- [83] TRUAN, J. S. ; CHEN, J. ; THOMPSON, L. U.: Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. In: *Molecular nutrition and food research* (2010)
- [84] UHL, Annett: Die konzentrationsabhängige Wirkung der lignanangereicherten Rohextrakte aus dem Leinsamen Linum usitatissimum und dem Kürbiskern aus dem Gartenkürbis Cucurbita pepo auf die Proliferation von Mammacarcinomzellen in-vitro, Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt, Rostock. (2009)
- [85] WALDSCHLÄGER, Juliane: Extraktion von Phytoestrogenen aus Leinsamen und Holunderblüten zur in-vitro-Testung an Hormonrezeptor-positiven Tumorzellen, Universitätsfrauenklinik Rostock. (2006)
- [86] XIANSHENG, Zuo ; YUANQING, Wu ; JEFFREY, S. ; MORRIS, Julie B. ; STIMMEL, Lisa M. ; LEESNITZER, Susan M. ; FISCHER, Scott M. ; LIPPMAN, Imad S.: Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR- β/δ suppression of PPAR- γ activity. In: *Oncogene* (2006)
- [87] YAGER, J. D. ; DAVIDSON, N. E.: Estrogen carcinogenesis in breast cancer. In: *N Engl J Med* (2006)
- [88] YANG, Du M.: Low-dose dietary genistein negates the therapeutic effect of tamoxifen in athymic nude mice. In: *Carcinogenesis* (2012)
- [89] YUE, W. ; WANG, J. P. ; LI, Y. ; BOCCINFUSO, W. P.: Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. In: *Clin Cancer Res* (2005)
- [90] ZANDWAR, Anand A. ; HEDGE, V. M. ; BODHANKAR, Subhash L.: Cardioprotective activity of flax lignan concentrate extracted from seeds of Linum usitatissimum in isoproterenol induced myocardial necrosis rats. In: *Interdisip Toxicol.* (2011)
- [91] ZITTERMANN, A.: Phytoestrogens. In: *Zentralblatt Gynakol* (2003)

Kapitel 7

Thesen

1. Das Mammakarzinom ist die häufigste Todesursache bei Frauen.
2. Es existieren bereits eine Reihe wirksamer Chemotherapeutika zur Behandlung des Mammakarzinoms. Dazu gehören Zytostatika, Antikörper und Immunmodulatoren.
3. Die Östrogene sind weibliche Sexualhormone. Sie entfalten ihre Wirkung an verschiedenen Geweben über den Östrogenrezeptor.
4. Japanerinnen erkranken wesentlich seltener an Brustkrebs als Frauen, die sich ohne einen hohen Anteil an Soja ernähren. Im Soja sind die Phytoöstrogene enthalten, die unter anderem für die krebshemmende Wirkung verantwortlich gemacht werden.
5. Die Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt. Sie zeigte bereits vielfältigen Einsatz in der Nahrungsmittel- und Gewebeproduktion und ist derzeit Gegenstand in der Diskussion als Bestandteil einer gesunden Ernährung. Mit dieser Arbeit und den Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock konnte gezeigt werden, dass auch in Pflanzen, die aus der Heimat stammen, Phytoöstrogene enthalten sind.
6. Phytoöstrogene gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen und lassen sich in drei Gruppen einteilen: die Isoflavone, die Lignane und die Coumestane. Eine gemeinsame Wirkung aller Phytoöstrogene ist ihre östrogene Aktivität. Sie ähneln auch in ihrer Struktur den Östrogenen.
7. Die Wuchsdauer der Pflanze spielt eine Rolle bei ihrer Wirkung. In Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock hat sich gezeigt, dass die Leinpflanze eine ausreichende Zeit zum Wachstum haben sollte, um die letztendlich optimale Zusammensetzung der wirksamen Inhaltsstoffe zu enthalten.
8. Die in dieser Arbeit verwendete Pflanze ist unter Freilandbedingungen kultiviert worden. Die äußeren Einflüsse spielen eine Rolle beim Wachstum und auch bei der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe.
9. Nach Analyse mittels Immunhistochemie exprimieren die in dieser Arbeit verwendeten Mammakarzinomzellen MCF-7 die Östrogenrezeptoren α und β sowie den Progesteronrezeptor.

10. Mittels Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie wurden die Substanzen im Leinwurzelextrakt analysiert. Antikanzerogene Effekte werden vermutlich vor allem durch die im Extrakt enthaltenen Polyphenole mit den Lignanen, Isoflavonen und Lignindimeren und durch die Fettsäuren verursacht.
11. Die Leinpflanze besteht unter anderem aus Blättern, Stängeln und der Wurzel. Es hat sich in Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik gezeigt, dass die Wurzel der Leinpflanze den stärksten zytotoxischen Effekt hat und den größten Anteil an Lignanen besitzt.
12. In den durchgeführten Tests mit dem Leinwurzelextrakt zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit. In den hohen Konzentrationen des Leinwurzelextrakts zeigt sich ein hemmender Effekt auf die Zellen.
13. Das Tamoxifen zeigt in dieser Arbeit einen hemmenden Effekt auf die Krebszellen, vor allem im LDH- und MTT-Test. Im BrdU-Test zeigt sich keine hemmende Wirkung des Tamoxifens.
14. Ziel dieser Arbeit ist es, die kumulative Wirkung von Leinwurzelextrakt und Tamoxifen bei gemeinsamer Gabe auf östrogenpositive Mammakarzinomzellen zu untersuchen.
15. Die Wirkungen des Leinwurzelextrakts werden wahrscheinlich nicht ausschließlich durch die Phytoöstrogene vermittelt. Es ist zu vermuten, dass das Extrakt insgesamt als Gemisch von wirksamen Substanzen auf die Zellen einwirkt. Für die genauere Analyse dieser Substanzen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Kapitel 8

Anhang

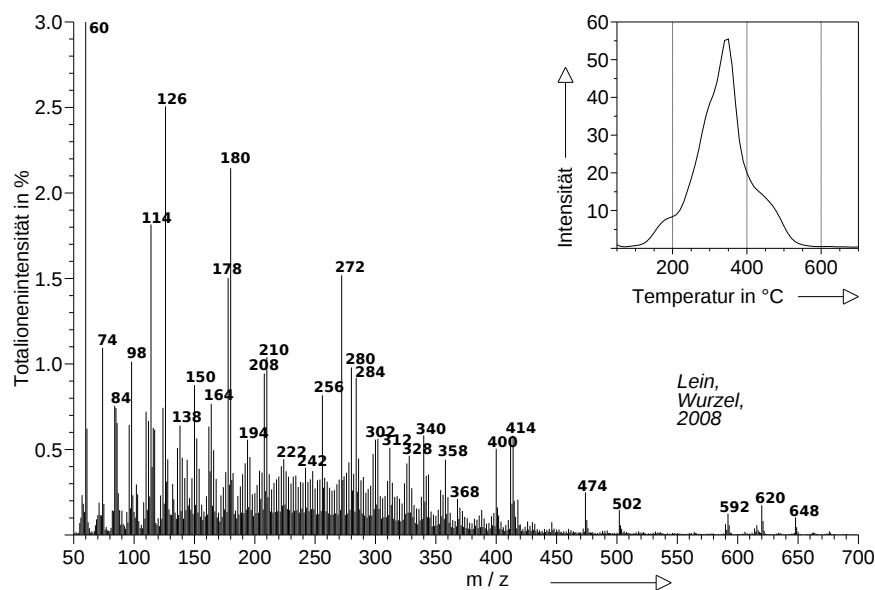


Abbildung 8.1: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie in Massensignalen m/z (Leinwurzel).

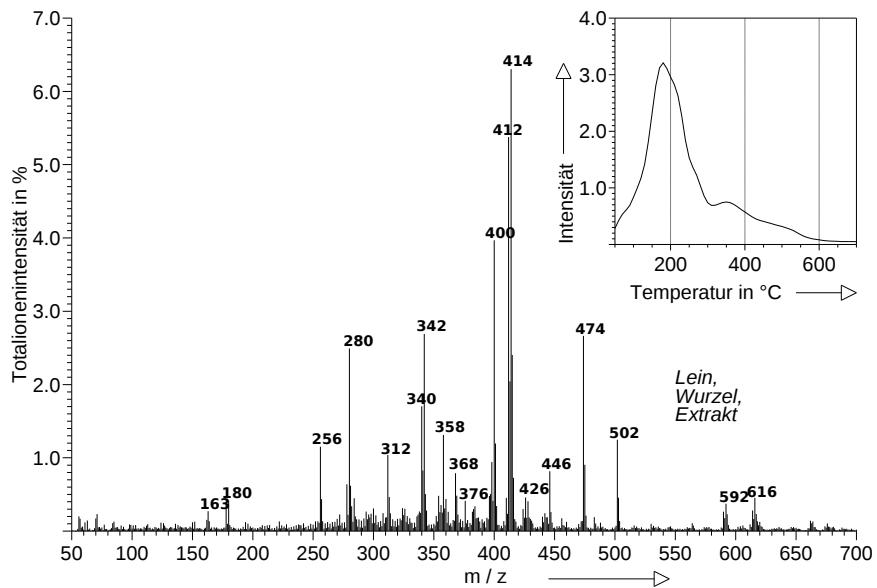


Abbildung 8.2: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie in Massensignalen m/z (Leinwurzelextrakt).

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. V. Briese für die Bereitstellung des Themas, für seine Geduld und sein Verständnis bei den zahlreichen Gesprächen zur Thematik sehr herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter für die Unterstützung, aber auch für die angenehmen und ebenso unterhaltsamen Gespräche während meiner gesamten Forschungsarbeit.

Ich bedanke mich beim gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die stetige Unterstützung, der Geduld beim Erklären und Anleiten für die Versuche. Hiermit möchte ich mich im Besonderen bei Frau Greschkowitz und bei Marlen Szewczyk bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Nicht zu vergessen sind auch die gemeinsamen Veranstaltungen, bei denen ich mich im Forschungslabor immer willkommen und sehr wohl gefühlt habe.

Für die Unterstützung bei der Extraktion der Leinwurzeln danke ich Frau Bauer.

Für die massenspektrometrischen Analysen und die geduldige Erläuterung zu der Thematik danke ich Herrn Dr. A. Schlichting vom Steinbeis-Transfer-Zentrum Groß Lüsewitz.

Und natürlich gilt mein Dank auch meiner Familie, die mir in dieser Zeit immer zur Seite stand und mir half, wo es möglich war.